

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glutathion peroxydase et la catalase : leur effet sur les chondrocytes en culture

Zachary, Marie-Denise

*Award date:*  
1987

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1987



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTÉ DES SCIENCES

---

**CARACTERISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES  
CONTRE LA GLUTATHION PEROXYDASE ET LA CATALASE.  
LEUR EFFET SUR LES CHONDROCYTES EN CULTURE.**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques  
par

**MARIE-DENISE  
ZACHARY**

Au terme de ce travail ponctué d'efforts, de persévérance, de quelques moments difficiles et de beaucoup d'autres agréables, s'annonce le temps des remerciements.

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le Professeur J. Remacle pour m'avoir permis l'accès à son laboratoire et pour sa gentillesse, ses conseils précieux et ses encouragements toujours bienvenus.

Je voudrais également témoigner ma profonde reconnaissance au Docteur Thierry Leclipteux pour m'avoir guidée tout au long de ce mémoire et pour avoir supporté et répondu, toujours consciencieusement, à mes innombrables questions.

Je tiens aussi à remercier particulièrement Carine Michiels qui m'a initiée à la technique de microinjection. Je n'oublierai pas ses remarques constructives ni son assistance opportune.

Je désire aussi exprimer ma gratitude au Docteur Jean-Jacques Letesson qui a fourni différents produits nécessaires à certaines expériences. Qu'il soit remercié pour sa disponibilité constante et pour ses conseils perspicaces qui m'ont permis de progresser.

Enfin, je tiens à exprimer mes profonds remerciements à toute l'équipe du laboratoire de biochimie cellulaire pour leur dynamisme dont l'éloge n'est plus à faire et pour leur sympathie à l'égard des trois "petites" mémorantes de cette année.

Merci, Andrée et Edouard, pour votre soutien constant et pour avoir mis à notre disposition vos compétences techniques pendant toute cette année.

Merci, Isabelle, pour ton aide aussi multiple qu'efficace quand le temps manquait.

Merci, Vincent et Etienne, pour votre humour "dévastateur" auquel aucun découragement ne résiste.

Merci, Martine, Philippe, Etienne, Eric, Marc, Gérard, Anne, Marie, que ce soit pour les discussions fructueuses qui ont suscité les réflexions et les questions, ou pour vos gestes d'encouragements, votre compréhension, vos réponses à mes questions, ou encore tout simplement pour votre gentillesse et votre sourire, qui ont rendus ces quelques mois agréables et intéressants.

J'ai envie de remercier ici également Manoëlle, Olivier, Michel, Marie-Françoise, François-Xavier, Vincent et les autres de leur amitié stimulante lors des périodes de découragement autant que dans les moments d'amusements.

Et pour terminer, merci à Jonathan, Mark, Eric et Dick pour avoir assuré la détente et suscité les passions lors de cette fin d'année quelques fois trop stressante.

Marie - Denise

## **TABLE DES MATIERES**

### **CHAP. 1 : INTRODUCTION**

#### **A. LES RADICAUX LIBRES**

1. Production
2. Toxicité

#### **B. LES PROTECTIONS CONTRE LES RADICAUX LIBRES**

### **CHAP. 2 : MATERIELS ET METHODES**

#### **A. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX**

1. L'immunisation
2. Un jour avant la fusion
3. La fusion
  - a. Les cellules spléniques
  - b. Les cellules cancéreuses
  - c. L'agent fusionnant
  - d. La fusion
4. Clonage et sélection des clones positifs

#### **B. PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX**

1. Techniques
2. Passage sur une colonne protéine A-agarose
3. Concentration et dialyse

#### **C. CARACTERISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX**

1. Détermination de la concentration
2. Immunodiffusion
3. Détermination du titre
4. Dosage de la glutathion peroxydase
  - a. Solutions
  - b. Méthode pour un simple dosage de la glutathion peroxydase
  - c. Méthode suivie pour réaliser les courbes d'inhibition avec les anticorps
  - d. Remarques

5. Dosage de la catalase
  - a. Solutions
  - b. Méthode
  - c. Méthode suivie pour réaliser les courbes d'inhibition avec les anticorps
  - d. Remarque

#### D. MICROINJECTION

1. La culture de cellules
  - a. Culture de fibroblastes
  - b. Culture de chondrocytes
  - c. Culture en vue de la microinjection
2. La microinjection
  - a. Technique
  - b. Solutions injectées
  - c. Observation des cellules injectées

### CHAP. 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

#### A. LES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA CATALASE

Introduction

Caractérisation

1. La concentration
2. La classe
3. Le titre
4. Les courbes d'inhibition
  - a. Inhibition de l'enzyme pure
  - b. Inhibition de la catalase du surnageant de chondrocytes bovins et de fibroblastes humains
  - c. Inhibition de la catalase des organites subcellulaires

Conclusion

#### B. LES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA GLUTATHION PEROXYDASE

Introduction

Caractérisation

1. La concentration
2. La classe
3. Le titre

#### 4. Les courbes d'inhibition

- a. Inhibition de la glutathion peroxydase des érythrocytes bovins
- b. Inhibition de la glutathion peroxydase de fibroblastes humains
- c. Inhibition de la glutathion peroxydase de chondrocytes bovins

Utilisation des anticorps pour la microinjection des chondrocytes

### **CHAP. 4 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

### **BIBLIOGRAPHIE**

## Chapitre 1 : INTRODUCTION.

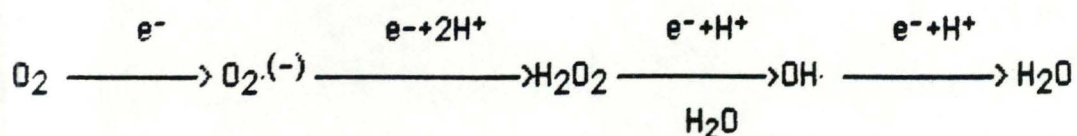
### A. LES RADICAUX LIBRES.

La dégénérescence cellulaire est un phénomène général en biologie, il fait partie du renouvellement normal de divers tissus mais peut s'accélérer dans des conditions pathologiques et à la fin du vieillissement d'un animal.

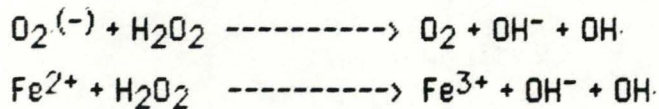
De nombreuses hypothèses ont été émises quant aux causes et aux mécanismes responsables des dégénérescences associées au vieillissement. L'une d'entre elles, faisant intervenir les radicaux libres (Gordon, 1974), suggère qu'ils pourraient jouer un rôle prépondérant dans des conditions pathologiques et dans le vieillissement des cellules (Leibovitz et Siegel, 1980; Fridovitch, 1978). C'est dans ce cadre que se situera notre travail.

#### 1. PRODUCTION

Les radicaux libres sont des molécules très réactionnelles produites lors de la réduction de l'oxygène. Cette réduction est un processus monovalent qui engendre d'abord la formation du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot(-)}$ ). Celui-ci peut ensuite réagir avec d'autres molécules pour aboutir à la formation de radicaux libres dont la grande réactivité s'explique par le fait qu'ils possèdent un électron non apparié sur l'orbitale externe :



Le radical superoxyde peut aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène créant de la sorte un radical encore plus réactionnel : le radical hydroxyle (OH·). Cette réaction, connue sous le nom de réaction d'Haber-Weiss peut être catalysée par des traces de fer ou d'autres métaux de transition tels que le cuivre :



Les radicaux libres sont produits dans la cellule par une série de processus (pour une revue, voir Mc Cord et Fridovitch, 1978; Roberfroid *et al.*, 1986) : les plus importants sont l'auto-oxydation de certaines molécules comme les hydroquinones, les catécholamines, la ferrédoxine..., l'activité de plusieurs oxydases comme la xanthine et l'aldéhyde oxydases (Fridovitch, 1978), les transferts d'électrons, notamment dans la membrane interne de la mitochondrie (Turrens et Boveris, 1980), lors du fonctionnement du cytochrome P450 du réticulum endoplasmique (Pederson, 1972) et lors de la phagocytose des polymorphonucléaires neutrophiles et des macrophages. Enfin, certaines agents extérieurs comme les radiations et l'ozone, et certaines molécules exogènes telles que le paraquat, l'adriamycine, la nitrofurantoïne, le benzopyrène, etc... peuvent augmenter la production de ces intermédiaires radicalaires (Trush *et al.*, 1982).

## 2. TOXICITE.

L'augmentation de la production de  $\text{O}_2^{(-)}$  montre que cette forme radicalaire cause de nombreux dégâts à la cellule :  $\text{O}_2^{(-)}$  peut tuer des

bactéries, inactiver des membranes biologiques, attaquer les acides nucléiques, les protéines et les polysaccharides.

Les radicaux libres attaquent principalement les lipides gras polyinsaturés conduisant à la production d'hydrocarbures volatils comme l'éthane et le pentane (Tappel et Dillard, 1981) et de malondialdéhyde (Tappel, 1981). Ce dernier, lié aux phospholipides, aux acides nucléiques ou aux protéines, donne naissance à des pigments non dégradables, tels que la lipoïuscine, qui s'accumulent progressivement dans les lysosomes (Tappel, 1973). Certains dérivés de la peroxydation lipidique, en particulier certains aldéhydes, présentent des propriétés cytotoxiques importantes (Comporti, 1965).

Hormis les lipides, il existe d'autres molécules qui possèdent des liaisons insaturées et qui constituent également la cible des attaques radicalaires. C'est ainsi que Lesko (1980), de même que Brawn et Fridovitch (1981) ont montré *in vitro* que 90 % des lésions de l'ADN après irradiation étaient dues à des attaques par  $\text{OH}\cdot$  et  $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ . Celles-ci peuvent notamment provoquer des scissions dans la chaîne d'ADN. Les protéines peuvent aussi être attaquées par les radicaux libres, surtout au niveau de leurs groupements thiols, ce qui entraîne souvent l'inactivation des enzymes (Halliwell, 1965).

## B. LES PROTECTIONS CONTRE LES RADICAUX LIBRES.

Un équilibre complexe entre la production de ces radicaux et la capacité qu'ont les cellules à neutraliser de telles molécules est nécessaire à la survie des organismes aérobies (Housset et Junot, 1983). Au cours de

l'évolution, les systèmes biologiques ont mis au point différents mécanismes de défense antioxydants.

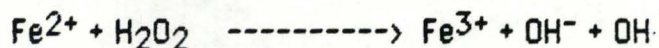
Trois enzymes sont d'importance primordiale (Leibovitz et Siegel, 1980; Junot, 1986) :

- les superoxydes dismutases qui catalysent la dismutation des radicaux superoxydes en oxygène et en peroxyde d'hydrogène :



Les superoxydes dismutases sont présentes, chez les eucaryotes, dans l'espace intermembranaire et la matrice des mitochondries ainsi que dans le cytosol (Mc Cord, 1979). Ces enzymes constituent la première ligne de défense de la cellule contre les formes radicalaires dérivées de l'oxygène.

Cependant, leur activité aboutit à la formation de peroxyde d'hydrogène également très toxique. Cette molécule est relativement stable mais peut être réduite par le radical superoxyde ou l'ion ferreux :



Cette réaction amène la production du radical hydroxyle, oxydant extrêmement puissant vis-à-vis des composants cellulaires. Il est notamment responsable de l'hémolyse des érythrocytes humains (Stock, 1973).

Il est donc nécessaire que le peroxyde d'hydrogène soit éliminé. C'est le rôle de deux autres enzymes :

- la catalase qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène :



- la glutathion peroxydase qui réduit les hydroperoxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène, et contribue de la sorte à l'intégrité des membranes biologiques .



A côté de ces enzymes, se trouvent des antioxydants naturels (Burton *et al.*, 1983; Doba *et al.*, 1985) dont les plus courants sont :

- l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E). Sa liposolubilité lui permet de s'insérer dans les membranes biologiques et de les protéger ainsi de la peroxydation lipidique en bloquant la propagation des radicaux peroxydes.

- l'acide ascorbique (vitamine C), au caractère hydrophile. Il joue en ce sens un rôle complémentaire à la vitamine E dans la défense contre les dérivés de l'oxygène.

- le glutathion qui, par son cycle, est indispensable dans la métabolisation de peroxydes lipidiques toxiques, dans la détoxification de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  extracellulaire (Suttorp *et al.*, 1986), dans l'activité de la glutathion peroxydase et dans la régénération de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$ -tocophérol.

Si ces mécanismes sont habituellement suffisants pour maintenir l'homéostasie cellulaire, une augmentation de la production radicalaire ou une diminution des défenses antioxydantes rompt cet équilibre et permet à la toxicité des radicaux de s'exprimer.

Envisageons, par exemple, le cas des chondrocytes articulaires et les attaques radicalaires qu'ils peuvent subir : dans les conditions physiologiques normales, les chondrocytes sont entourés d'une matrice

extracellulaire composée essentiellement de collagène et de protéoglycanes; le tout forme le cartilage en contact avec le liquide synovial contenant peu de polymorphonucléaires neutrophiles et de macrophages. L'attaque par les radicaux libres est donc très faible.

En cas d'inflammation, comme dans l'arthrite rhumatoïde, l'articulation subit une agression extérieure : l'espace articulaire est alors envahi par des polymorphonucléaires neutrophiles et des macrophages (Mainardi, 1985). Ces cellules sont activées, sécrétant notamment de la collagénase qui dégrade ainsi la matrice extracellulaire entourant les chondrocytes. Les chondrocytes sont dès lors exposés aux radicaux produits dans la capsule synoviale.

L'importance des systèmes de défense que possède la cellule a déjà été mise en évidence grâce à la technique de microinjection pour des cellules cultivées sous une atmosphère riche en oxygène (Raes *et al.*, 1987). A cette occasion, il a été montré que l'injection de chacune des trois enzymes protège efficacement des fibroblastes humains WI-38 soumis à une ou deux atmosphères d'oxygène à 95 % et de CO<sub>2</sub> à 5 %.

Dans ces conditions, ce sont la glutathion peroxydase et la catalase qui se sont montrées les plus actives aussi bien pour prévenir la mortalité des cellules que pour maintenir leur potentiel prolifératif.

Cependant ces expériences se déroulaient dans des conditions drastiques et non physiologiques pour la cellule : en effet c'est la production radicalaire qui était augmentée pour rompre l'équilibre existant dans la cellule entre l'accumulation des dérivés de l'oxygène et leur élimination par les systèmes enzymatiques ou naturels précédemment décrits. C'est pourquoi nous avons voulu apporter des renseignements complémentaires à ces recherches par une approche différente : nous avons pensé à la diminution spécifique de certaines défenses antioxydantes telles

que la catalase et la glutathion peroxydase, grâce à leur inhibition par des anticorps monoclonaux.

Dans ce mémoire, nous avons commencé le projet. La démarche a consisté à préparer divers anticorps monoclonaux, à les caractériser et à rechercher leur pouvoir inhibiteur, seuls et en combinaison. Ces anticorps seront alors microinjectés dans des chondrocytes bovins en culture afin d'examiner l'effet de leur présence intracellulaire sur la viabilité des cellules. Nous savons que plusieurs travaux, tels que ceux de Burke et Warren (1964), ont déjà utilisé avec succès les anticorps microinjectés afin d'inhiber certaines fonctions cellulaires.

Comment la cellule, qui restait dans des conditions physiologiques normales, allait-elle réagir à l'agression constituée par les anticorps ? Les défenses antioxydantes, glutathion peroxydase, catalase, etc..., seraient-elles suffisantes pour maintenir son intégrité ?

Ce sont les différentes questions qui nous ont guidés dans nos recherches.

Les premiers résultats qui seront présentés à la fin de ce travail, montrent qu'il est possible effectivement de les utiliser dans cette perspective mais l'exploitation systématique de l'inhibition des enzymes à l'intérieur du cytoplasme devrait être poursuivie et étendue à d'autres conditions de culture.

## Chapitre 2 : MATERIELS ET METHODES.

### A. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX.

La production d'anticorps monoclonaux à partir d'hybridomes a été mise au point par Köhler et Milstein (1975), (figure 1). Nous suivrons essentiellement cette technique avec quelques modifications telles que décrites par le Dr. J.J. Letesson.

#### 1. L'IMMUNISATION.

- Utiliser une souris BALB/c. Ces souris présentent l'avantage d'être syngéniques entre elles; on pourra donc réimplanter un hybridome produit sur une souris de même type sans craindre de problème de tolérance de cette greffe.

- L'immuniser avec l'antigène contre lequel on veut produire des anticorps (Ozato K. *et al.*, 1980). L'immunisation se fait habituellement de cette façon :

+ Une première injection a lieu dans les coussinets plantaires de la souris avec de l'adjuvant de Freund qui empêche une métabolisation trop rapide de l'antigène et stimule le système immunitaire. On choisit cet endroit car les coussinets plantaires renferment nombre de ganglions périphériques comprenant des lymphocytes, ce qui permet une réaction rapide même avec peu de matériel.

+ Une seconde injection se fait un mois plus tard de façon intrapéritonéale sans adjuvant.

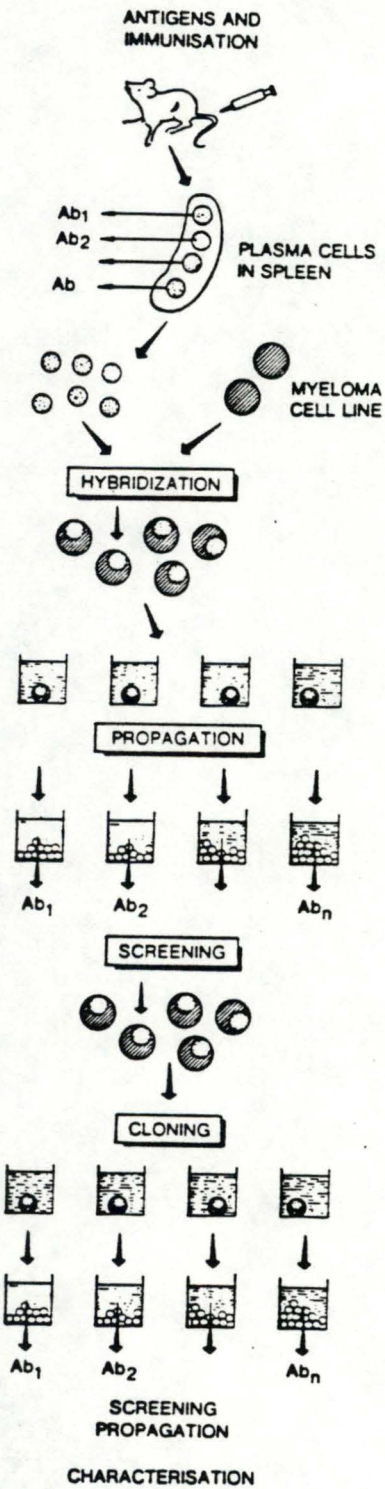


FIGURE 1

Représentation schématique des différents stades de l'hybridisation, de l'immunisation à la caractérisation d'un anticorps monoclonal.

Pour la catalase (from bovine liver, Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA), l'immunisation s'est déroulée comme suit :

- la première injection de l'antigène s'est faite dans les coussinets plantaires de trois souris BALB/c mâles à raison de 97  $\mu\text{g}$  de catalase dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate de sodium 10 mM; pH 7,5; NaCl 0,15 M (PBS) et d'adjuvant de Freund, pour chacune des souris.

- un rappel a eu lieu 1 mois plus tard. L'injection était intrapéritonéale et composée de 95  $\mu\text{g}$  d'enzyme dans 200  $\mu\text{l}$  de PBS, par souris.

Pour la glutathion peroxydase, la manipulation s'est déroulée de la façon suivante :

- une première injection de 75  $\mu\text{g}$  de glutathion peroxydase (from bovine erythrocytes, Sigma), par souris, dans 100  $\mu\text{l}$  de PBS et d'adjuvant de Freund a lieu dans les coussinets plantaires de trois souris BALB/c femelles.

- elle est suivie, 30 jours plus tard d'une deuxième injection intrapéritonéale de l'antigène à raison de 112  $\mu\text{g}$  par souris, dans 150  $\mu\text{l}$  de PBS.

- ensuite, on a pratiqué un troisième (2 semaines plus tard) et quatrième (1 mois après le précédent) rappels également intrapéritonéaux, de 127  $\mu\text{g}$  de glutathion peroxydase par souris, dilués dans 150  $\mu\text{l}$  de PBS.

## 2. UN JOUR AYANT LA FUSION.

- Préparer une couche nourricière (feeder layer) de cellules péritonéales de rat qui seront cultivées en micropuits (Boîtes de 96 puits, PVC rigide, Sterilin Flow, Feltham, England). Ces cellules serviront à apporter les facteurs de croissance nécessaires à la survie

des hybridomes. De plus, nous avons choisi de prélever ces cellules car parmi elles, se trouvent aussi des macrophages qui digéreront les déchets toxiques pour les cellules.

Cette couche nourricière se prépare de la façon suivante :

- Endormir un rat à l'éther pour narcose.
- Raser et nettoyer une plage du ventre.
- Placer le rat sur une table de contention sous hotte et désinfecter le ventre à l'alcool.
- Injecter 20 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA).
- Masser le flanc et le ventre.
- Désinfecter à l'alcool.
- Retirer l'épiderme sur quelques  $\text{cm}^2$ .
- Inciser le derme au milieu de la plage formée de façon à y introduire une pipette de 10 ml.
- Aspirer le maximum de milieu et le placer dans un tube stérile de 25 ml (Sterilin, Feltham, England).
- Compter les cellules et ajuster à  $100 \times 10^3$  cellules / ml.
- Distribuer en boîtes (96 puits, PVC rigide, STERILIN FLOW), à raison de  $10 \times 10^3$  cellules / puit dans 100  $\mu\text{l}$ .
- Mettre les boîtes à  $37^\circ \text{C}$ , dans une atmosphère de 5%  $\text{CO}_2$  jusqu'au lendemain.

### 3. LA FUSION.

#### a. Les cellules spléniques.

- Placer 2 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Merck, Darmstadt, FRG; 8,3 gr/L, mis à pH 7,5 avec du  $\text{NaOH}$ , filtré sur filtre stérile Sartorius 0,2  $\mu\text{m}$ ) dans un homogénéiseur de Potter stérile.

- Prélever stérilement la rate de la souris immunisée et la placer dans ce volume.

- Broyer doucement et ajouter 8 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  qui va permettre la lyse des globules rouges prélevés en même temps que les lymphocytes et augmentera ainsi la fréquence des collisions entre les leucocytes et les cellules myélomateuses.

- Vider la suspension cellulaire dans un tube de 10 ml stérile (Sterilin) et centrifuger 10 min à 1200 RPM à la centrifugeuse de table (Hettich Universal).

- Resuspendre le culot dans 10 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco).

- Prélever 50  $\mu\text{l}$  de la suspension et y ajouter 50  $\mu\text{l}$  de bleu Trypan.

- Compter les cellules vivantes.

#### b. Les cellules cancéreuses.

- Un bon myélome doit répondre à certains critères avant d'être choisi pour une fusion :

- + il est préférable qu'il ne sécrète pas d'immunoglobulines (Ig) par lui-même sinon l'hybride issu de la fusion entre ce type de myélome et une cellule splénique produira les chaînes lourdes et les chaînes légères codées par les deux cellules parentales, ce qui rendra possible la formation de plusieurs combinaisons entre ces chaînes et produira donc plusieurs types d'Ig. L'hybride ne serait pas monoclonal.

- + une fois hybridé avec la cellule splénique, il doit sécréter de fortes concentrations en Ig.

- + il doit exprimer un caractère qui permette de faire pousser uniquement les hybrides, en présence des souches parentales. Nous avons choisi un plasmocytome non sécrétant et hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) déficient (cet hybridome est le

SP2/0, dérivé du myélome BALB/c : P3-X63-Ag8). Dans un milieu HAT (Hypoxanthine, aminoptérine, thymidine), l'aminoptérine bloque la principale voie de biosynthèse des acides nucléiques (figure 2). Les cellules peuvent continuer à se multiplier, en utilisant une voie alternative, à condition de leur donner de l'hypoxanthine et de la thymidine, et si elles possèdent les enzymes HGPRT et thymidine kinase nécessaires à l'entrée de ces substrats. Les SP2 non fusionnées meurent car elles sont déficientes en HGPRT tandis que les cellules spléniques périssent de façon naturelle. Ce milieu est donc dit "semi-sélectif". Seuls y survivent les hybridomes.

*Mode opératoire suivi pour les cellules SP2 :*

- Laver trois fois dans du milieu RPMI 1640 en même temps que les cellules spléniques.
- Resuspendre le culot dans 10 ml de milieu RPMI.
- Prélever 50 $\mu$ l de la suspension et y ajouter 50 $\mu$ l de bleu Trypan.
- Compter les cellules vivantes.

c. L'agent fusionnant.

Nous avons choisi le polyéthylène glycol (PEG), mais d'autres ont déjà utilisé le virus de Sendai inactivé, la lysolécithine ou le diméthyl sulfoxyde.

*Reconstitution du PEG*

- 3 gr de PEG 4000 (Merck) à autoclaver 20 min à 120° C.
- Mettre en solution dans du RPMI chaud (40°C) à une concentration de 1 gr/ml.
- Ajuster à pH 7,5 avec du NaOH stérile filtré (Sartorius 0,2 $\mu$ m).

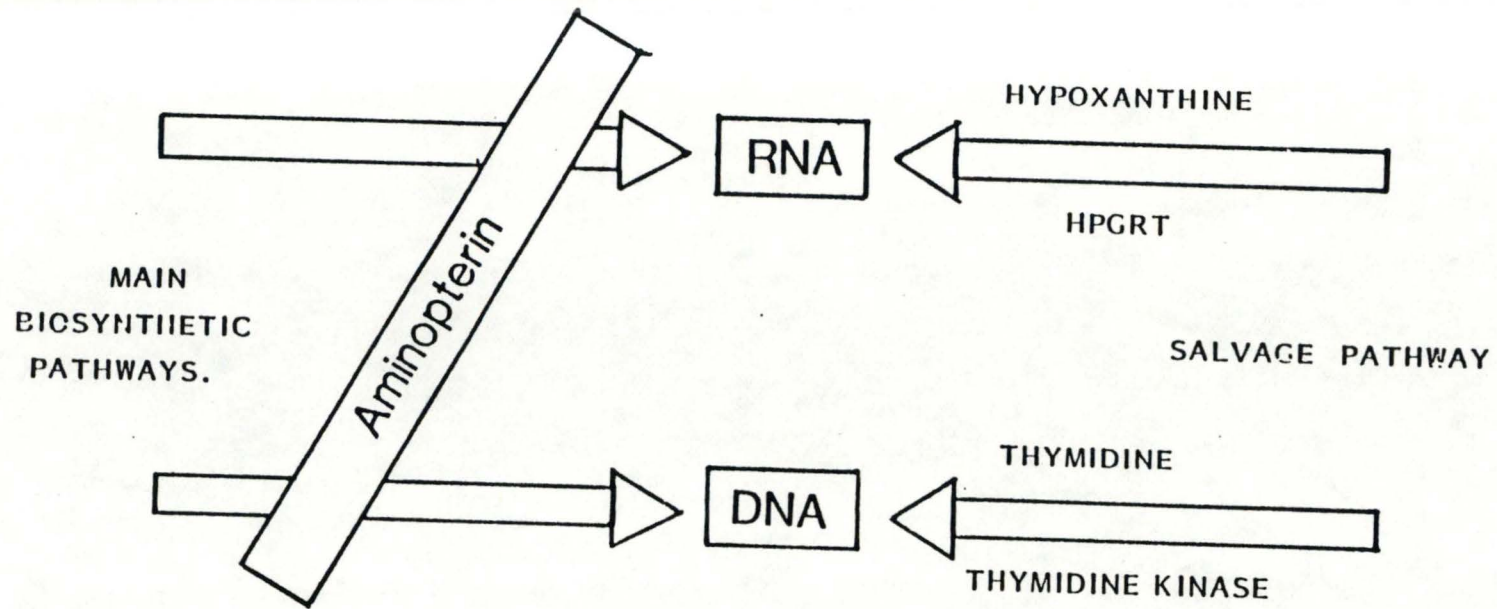


FIGURE 2

Méthode de sélection par un milieu HAT :

- les cellules spléniques meurent naturellement en culture.
- le myélome, déficient en HGPRT, meurt par incapacité de synthèse des acides nucléiques.
- l'hybride qui possède HGPRT se multiplie.

*Schéma repris de "Current advances in laboratory techniques",  
Department of Immunology, Royal Postgraduate Medical School,  
Hammersmith Hospital, London.*

#### d. La fusion.

Elle s'est faite, pour la catalase et la glutathion peroxydase, 4 jours après la dernière injection de l'antigène.

##### *Mode opératoire :*

- Après comptage, calculer un rapport cellules SP2/cellules de rate compris entre 1/4 et 1/10.

- Après les dilutions éventuelles, resuspendre les cellules SP2 et spléniques dans un tube conique (Sterilin) : prélever 10 ml de la suspension de cellules spléniques et ajouter le volume nécessaire de SP2 en fonction du rapport désiré.

- Diviser ce volume en deux tubes coniques (50 ml, Sterilin).

- Centrifuger 10 min à la centrifugeuse Internationale à 1200 RPM.

- Evacuer le surnageant et décoller doucement mais avec décision le culot à sec en tapant le fond du tube sur la table.

Par la suite, la manipulation se continue à 37° C et doit être effectuée très délicatement.

- Ajouter sur le culot 1 ml de PEG 4000 dans le milieu RPMI à 37° C en 90 sec.

- Diluer le PEG en ajoutant goutte à goutte du milieu RPMI selon la procédure suivante :

. 0,5 ml en 90 sec

. 1,0 ml en 90 sec

. 2,0 ml en 90 sec

. 4,0 ml en 90 sec

- Centrifuger 10 min à 1000 RPM à l'Internationale.

- Resuspendre dans 35 à 40 ml de milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal (FCS, Gibco) et mettre à 37° C pendant au moins deux heures.

- Centrifuger 10 min à 1000 RPM dans la centrifugeuse Internationale.

- Resuspendre dans du milieu RPMI contenant 10% de FCS (serum de veau foetal) et 2% de HAT (Gibco, 136 µg/ml hypoxantine + 0,19 µg/ml aminoptérine + 3,66 µg/ml thymidine) dont le volume dépend du nombre de cellules spléniques disponibles.

- Distribuer dans les boîtes de 96 puits (PVC rigide, STERILIN FLOW) préparées la veille avec la couche nourricière à raison de  $100 \times 10^3$  cellules/puit dans 100 µl.

Une fois la fusion réalisée, l'avenir des hybrides est incertain. Les produits de la fusion sont instables génétiquement de par le doublement du nombre chromosomique. C'est pourquoi, lors des premiers jours l'hybride va perdre des chromosomes. Par la suite, cette perte s'arrête et l'hybride se stabilise à un nombre chromosomique intermédiaire entre le diploïde et le tétraploïde. Cependant, parmi les chromosomes perdus peut se trouver un gène impliqué dans la production ou la sécrétion des anticorps. Le clone devient alors non-sécrétant. C'est pourquoi une sélection s'avère nécessaire.

#### 4. CLONAGE ET SELECTION DES CLONES POSITIFS (figure 3).

- Les hybridomes sont renourris tous les deux jours pendant environ 15 jours avec du milieu RPMI/HAT/10% FCS, et ensuite avec du milieu RPMI/HT/10% FCS. Ce passage en milieu HT (= milieu HAT sans aminoptérine) permet le rétablissement progressif de la voie de

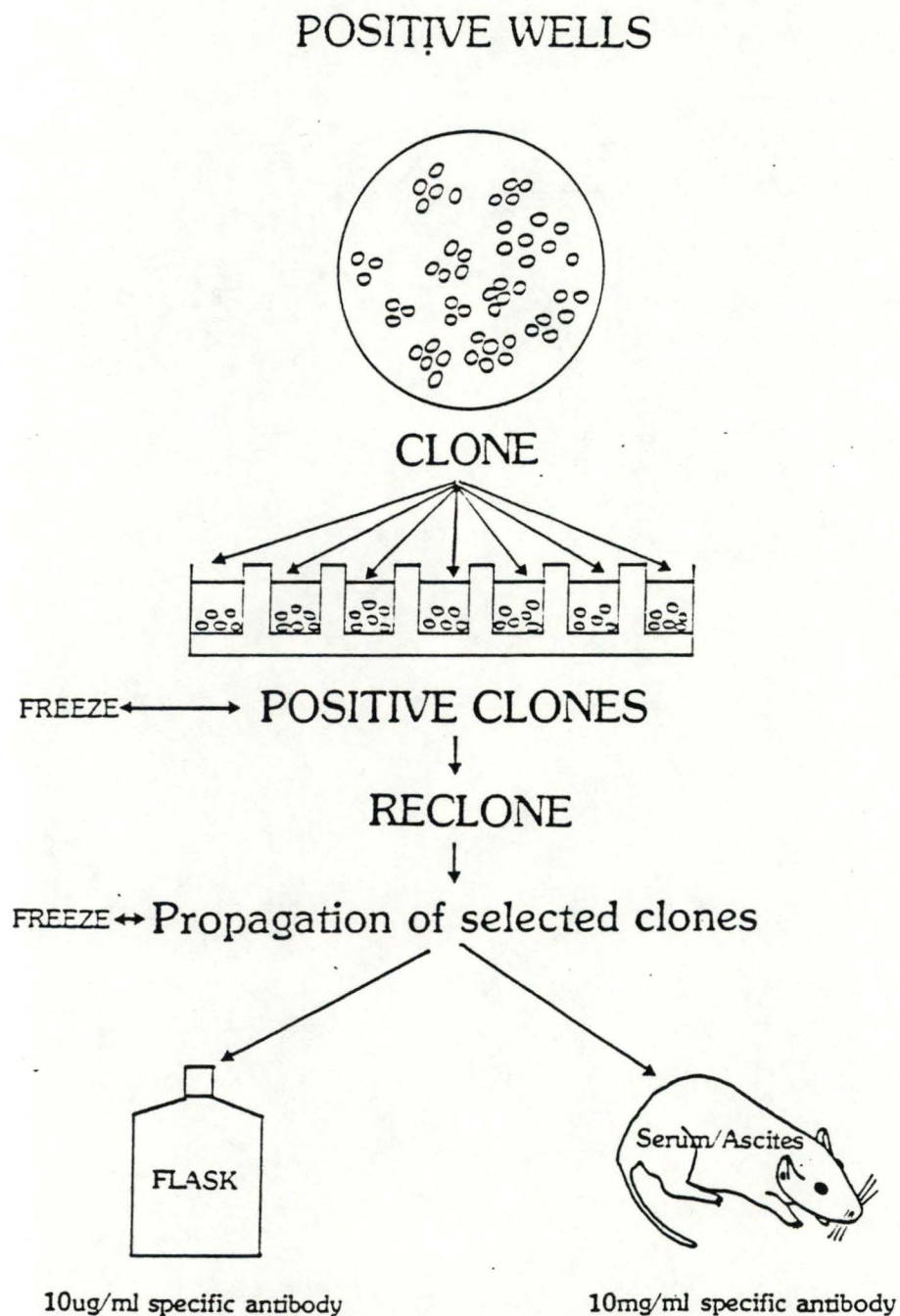


FIGURE 3

Méthode de sélection, de clonage et de production des hybrides.

*Schéma repris de "Current advances in laboratory techniques",  
Department of Immunology, Royal Postgraduate Medical School,  
Hammersmith Hospital, London.*

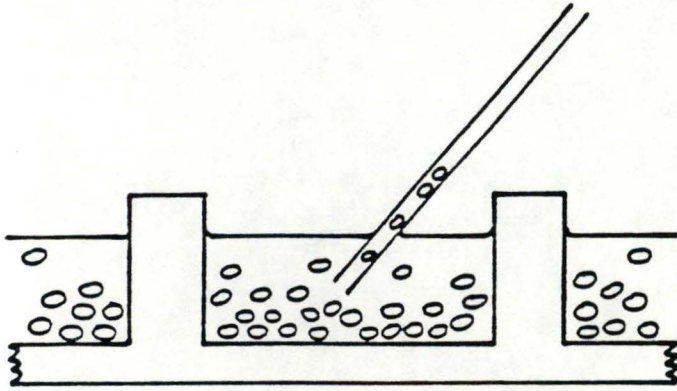
synthèse "de novo" des acides nucléiques, tout en fournissant toujours les précurseurs thymidine et hypoxanthine nécessaires à la voie de récupération.

- Environ 20 jours après la fusion, les puits contenant des clones sont sélectionnés grâce à un test ELISA (vérification de la présence et de la fixation, sur l'antigène, de l'anticorps du surnageant [milieu de culture recouvrant les cellules hybrides en croissance et recueillant les anticorps sécrétés]). Les clones sont également testés quant à leur pouvoir d'inhibition sur l'enzyme. Ceux qui sont positifs pour les deux tests sont alors resuspendus dans 1 ml de cellules endothéliales (couche nourricière) en vue de les cloner.

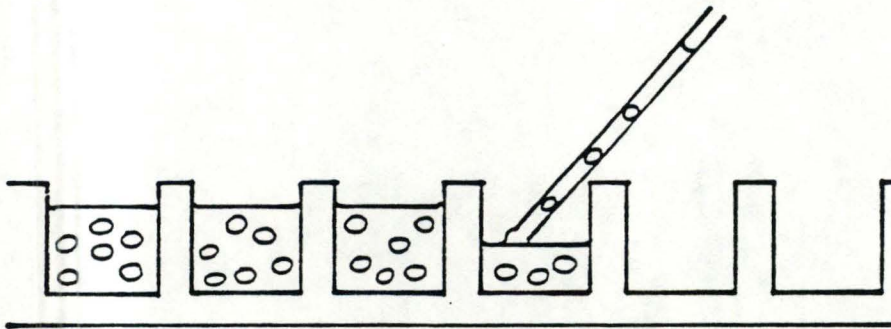
Il est indispensable, lors de cette étape, de s'assurer qu'un clone ne produira qu'une seule immunoglobuline. Pour cela nous avons choisi la technique de la dilution limite (figure 4) selon laquelle les cellules des puits révélés positifs sont diluées à différentes concentrations : 0,1; 1 ou 10 cellules par puit et distribuées ainsi en macropuits (Boîtes de 24 puits, Gibco, Nunc) sur une couche nourricière; son rôle est ici primordial. Comme lors de la fusion, elle apporte à l'hybride les facteurs de croissance et digère les produits toxiques susceptibles de lui nuire. Grâce à cette technique, on verra croître, dans quelques puits, des clones issus d'une cellule unique.

La croissance des clones est suivie régulièrement et, si dans un puit on repère distinctement deux colonies, celles-ci sont éliminées.

Lorsque le clone est bien développé, il est à nouveau testé et cultivé alors dans une boîte Falcon de 25 cm<sup>2</sup>. A partir de ce moment, on peut soit recueillir le surnageant contenant les anticorps dont la concentration sera alors comprise entre 1 et 10 µg/ml, ou injecter les cellules (à une concentration de 500 x 10<sup>3</sup>/ml) dans la cavité péritonéale d'une souris syngénique avec les donneuses (figure 3). Cette injection suit de deux semaines une injection de 0,5 ml de pristane (2-



Dilution à 10 cellules/ml.



Dilution à 0,1 cellule/ml.

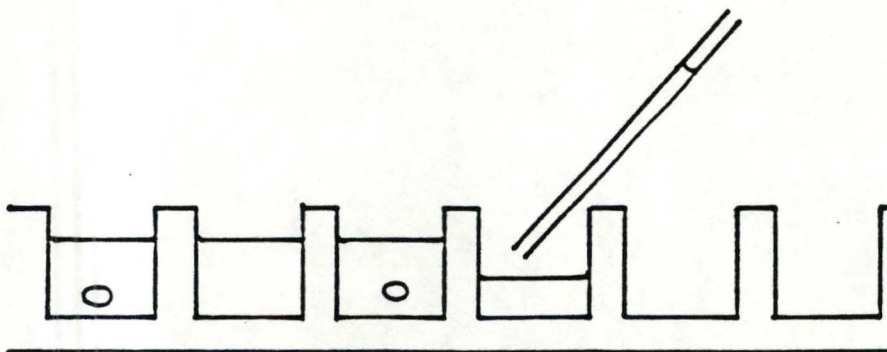


FIGURE 4

Technique de la dilution limite.

*Schéma repris de "Current advances in laboratory techniques",  
Department of Immunology, Royal Postgraduate Medical School,  
Hammersmith Hospital, London.*

6-10-14 tétraméthylpentadécane, Aldrich, Belgium), irritant chimique qui va créer une inflammation et des conditions optimales pour le développement des cellules injectées. Là se développera un ascite riche en Ig que l'on peut recueillir. C'est ce dernier moyen que nous avons utilisé. Il présente l'avantage d'augmenter grandement la quantité d'anticorps disponibles (de 1 à 10 mg/ml).

## B. PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX.

### 1. TECHNIQUE.

Il existe différentes techniques de purification des immunoglobulines :

- la précipitation grâce au sulfate ammonique qui permet une purification des protéines par l'effet du salting out.

- la purification grâce à l'acide caprylique qui précipite la plupart des protéines mais pas les IgG. Son principal avantage réside dans une moindre formation d'agrégats, en comparaison avec la méthode de précipitation par le sulfate ammonique. Le rendement obtenu de cette façon est de 60 à 80 % (Russo *et al.*, 1983).

- la chromatographie échangeuse d'ions : les IgG sont les Ig les moins négatives d'un sérum de protéines, c'est pourquoi elles sont relativement facilement purifiées sur une matrice échangeuse d'ions

chargée positivement (DEAE cellulose ou Sephadex), (Mason, Williams, 1980).

- la chromatographie sur tamis moléculaire, essentiellement en HPLC ou FPLC.

- la chromatographie d'affinité telle que l'utilisation de la protéine A couplée à l'agarose. C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée et que nous allons détailler quelque peu.

La protéine A est une chaîne polypeptidique simple, d'un poids moléculaire de 42000, préparée à partir d'une souche de *Staphylococcus aureus*. Elle est stable sur une large gamme de pH et présente la particularité de se lier à la portion F(c) des immunoglobulines. Son affinité et sa rapidité de liaison sont plus grandes pour les IgG, qu'elle permet dès lors d'isoler.

Cependant sa capacité de liaison pour telle ou telle sous-classe d'IgG est largement dépendante du pH. C'est pourquoi on peut éluer sélectivement les différentes sous-classes d'IgG en choisissant des pH appropriés : les IgG1 sont éluées à pH 6, les IgG2a à pH 4,5 et les IgG2b ainsi que les IgG3 à pH 3,5. Ces chiffres ne sont valables que pour la souris (Ey *et al.*, 1978).

Il est à remarquer que le fait que la protéine A ne purifie que les Ig de classe G ne constitue pas un problème majeur. En effet, lors d'une double immunisation avec un antigène soluble (comme nous l'avons faite), les IgM produits lors de la première partie de la réponse, ont largement laissé la place aux IgG qui constituent la grande majorité de la réponse secondaire.

Actuellement, une nouvelle protéine, la protéine G est également mise sur le marché. Elle est aussi extraite d'une souche de

Staphylocoques et présente une meilleure affinité que la protéine A pour les IgG (Akerstrom *et al.*, 1985). De plus, elle reconnaît toutes les sous-classes dans presque toutes les espèces.

## 2. PASSAGE SUR UNE COLONNE PROTEINE A - AGAROSE (Bio Rad, NY, USA, Affigel Protein A MAPS II).

Un exemple de chromatogramme est présenté à la figure 5.

*N.B.* La composition des tampons de liaison, d'éluion aussi bien que de régénération reste encore à ce jour non divulguée par la firme.

### *Mode opératoire :*

- Dilution de deux fois l'ascite dans du tampon de liaison.
- Centrifugation à 39000RPM, pendant 20 min, à 0° C (BECKMAN, L2 65B, rotor de type 40).
- Equilibration de la colonne avec du tampon de liaison.
- Enregistrement à 280 nm.
- Dépôt de l'échantillon.
- Lavage de la colonne avec du tampon de liaison jusqu'à retrouver la ligne de base.
- Elution des Ig fixées avec le tampon d'éluion, pH 3 et recueil dans du Tris, 1M, pH 9.
- Régénération de la colonne avec du tampon de régénération.
- Conservation de la colonne dans du PBS + 0,05% d'azide.

## 3. CONCENTRATION ET DIALYSE.

- Concentration des Ig recueillis par ultrafiltration (Amicon, PM 10) jusqu'à un volume de 10 ml.

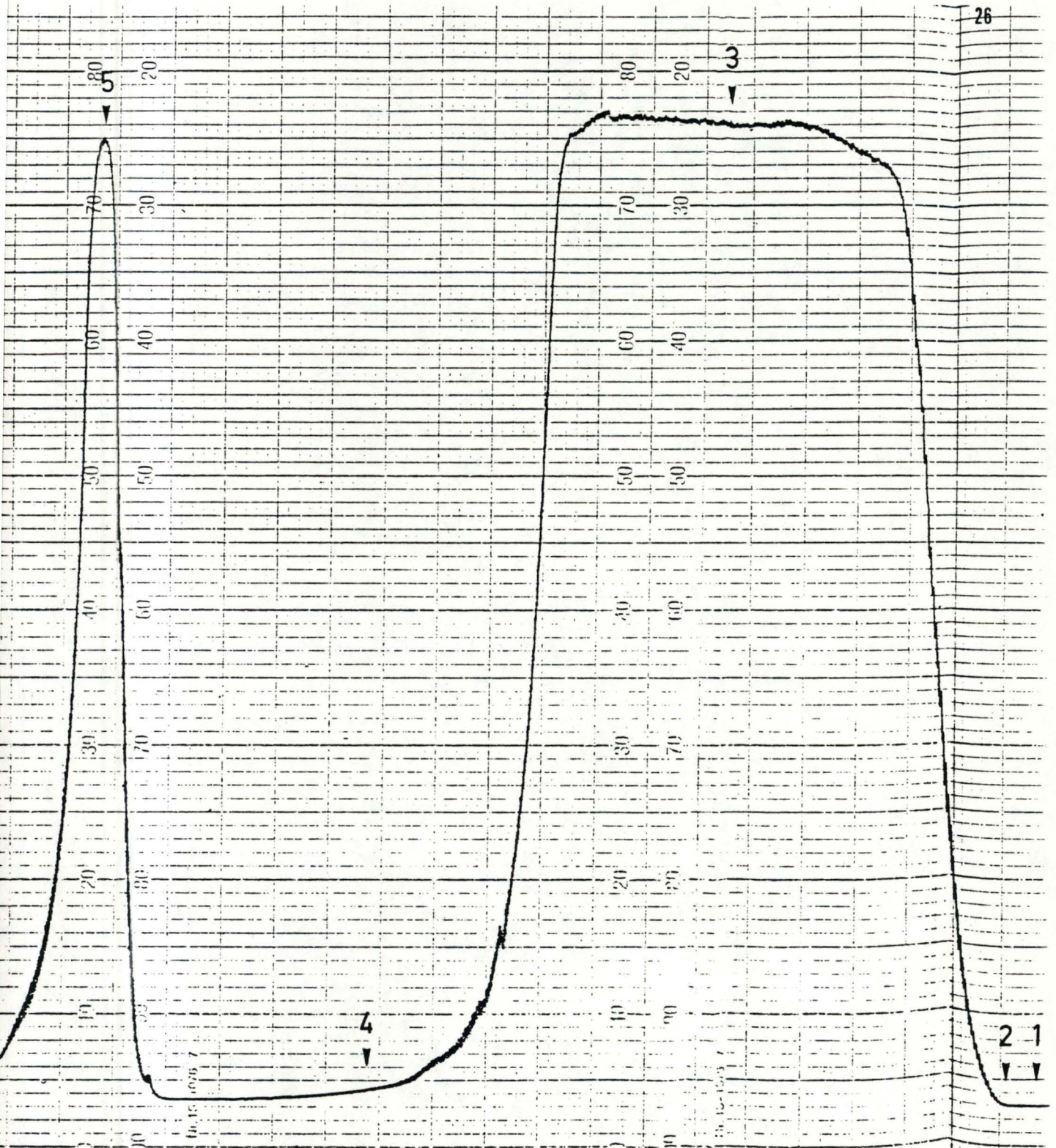


FIGURE 5

Chromatographie d'une préparation contenant des IgG, sur une colonne de protéine A-agarose (Bio-Rad).

1. Equilibration de la colonne avec du tampon de liaison.
2. Dépôt de l'échantillon.
3. Sortie des protéines autres que les IgG.
4. Lavage de la colonne avec du tampon de liaison.
5. Elution des IgG.
6. Régénération de la colonne.

- Dialyse contre trois fois 1,5 l de tampon phosphate de sodium, 10 mM, pH 7,5 contenant 0,15 M de NaCl (PBS).

- Concentration sur Amicon (PM 10) jusqu'à environ 2 ml.

## C. CARACTERISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

### 1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION.

Le dosage a été réalisé par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

### 2. IMMUNODIFFUSION.

Elle permet d'obtenir la classe des anticorps purifiés et se pratique sur gel d'agar, et contre des anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b (Miles) aimablement fournis par le Dr J.J. Letesson.

Le gel de migration des anticorps est préparé par dissolution, à 90°C, d'agarose (Difco) à la concentration de 1 % dans un tampon d'immunodiffusion (Tampon veronal constitué de diéthylbarbital; 0,071 M, pH 8,2, à une force ionique de 0,05  $\mu$ ). L'agarose liquide est coulé sur une lame de verre et se gélifie. Une matrice nous permet ensuite de creuser des puits disposés à égale distance les uns des autres. Dans un puit central, nous déposons un antisérum (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b et anti-IgM) et dans les puits périphériques, une solution de dilution voulue des anticorps purifiés.

- Déposer 15-20  $\mu$ l/puit d'anticorps à une concentration optimale d'environ 100  $\mu$ g/ml pour les anticorps à tester, et déposer les anti-sérums purs.

- Laisser les plaques pendant 36 H dans une boîte humide à 4° C.
- Laver avec NaCl 0,9 % pendant 24 H.
- Sècher à 37° C après avoir recouvert d'une feuille de papier Wathman humide.
- Laver à l'eau distillée.
- Colorer 1 h à l'amidoschwartz (solution comprenant 250 mg d'amidoschwartz, 200 ml d'alcool dénaturé, 50 ml d'H<sub>2</sub>O).
- Décolorer avec une solution comprenant 2 l d'alcool dénaturé, 500 ml d'acide acétique; 2,5 l d'H<sub>2</sub>O.
- Laisser sécher pendant deux jours à 20° C.
- Photographier.

### 3. DETERMINATION DU TITRE PAR ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

La détermination du titre de la solution d'anticorps nous permettra de connaître la quantité de matériel dont nous disposons, ce qui est utile lorsque, dans certaines expériences, l'on doit travailler à des concentrations saturantes ou, au contraire, dans des conditions non saturantes.

Nous avons rencontré quelques difficultés à mettre au point le mode opératoire pour réaliser un ELISA. Plusieurs essais avec de l'albumine (Boseral, Organon Teknica) à 1 % d'abord, puis avec un tampon PBS-Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma) 1 % se sont montrés infructueux. Nous obtenions une grande variabilité d'absorbance entre des puits identiques. Finalement nous avons adopté le mode opératoire suivant, avec comme

principal changement l'utilisation d'un tampon PBS-BSA 0,1 % lors des lavages :

- Incubation de l'antigène à raison de 50  $\mu$ l/puit pendant 6 h à 4° C (boîtes souples de 96 puits, Flow Laboratories).

La glutathion peroxydase (purifiée au laboratoire par E. Pigeolet selon la méthode de A. Grossmann et A. Wendel, 1985) se trouvait à une concentration de 14  $\mu$ g/ml et la catalase (Sigma) à une concentration de 2  $\mu$ g/ml.

- Lavage avec du PBS-BSA (Sigma) 0,1 %.

- Saturation avec du PBS-BSA 1 %, 100  $\mu$ l/puit pendant 1 h à 4° C.

- Incubation des anti-glutathion peroxydase et des anti-catalase, dilués dans du PBS-BSA 0,1 %, selon une concentration décroissante, 50  $\mu$ l/puit, toute la nuit à 4° C.

- Lavage avec du PBS-BSA 0,1 %.

- Incubation des IgG anti-souris couplés à la peroxydase (Prosan, P 161, dilués 500 fois dans du PBS-BSA 0,1 %) à raison de 50  $\mu$ l/puit, pendant 2 h à 37° C.

- Lavage avec du PBS-BSA 0,1 %.

- Ajouter dans chaque puit 50  $\mu$ l de la solution suivante : 4 mg d'ABTS (2-2' Azino-di-[3 éthyl benzthiazoline sulfonate(6)]) solubilisés dans 6 ml de tampon citrate, pH 5,6 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 115 mM, acide citrique, 42 mM), additionnés de 5  $\mu$ l d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30 % (Merck). Incuber 10 min à 37° C.

- Lecture à 405 nm sur un spectrophotomètre Microplate reader, MR 600.

Remarque : lors de chaque expérience, nous avons effectué plusieurs contrôles :

- incubation de l'enzyme avec un anticorps monoclonal autre que celui dirigé contre l'enzyme.

- incubation des IgG peroxydase seuls.

Ces valeurs ont été soustraites des mesures d'absorbance.

#### 4. DOSAGE DE LA GLUTATHION PEROXYDASE.

##### a. Solutions.

A =  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck) 60 mM, pH 6,5, EDTA 1mM.

B = NADPH (Sigma) 1,1 mM dans la solution A.

C = GSH (Sigma) 13 mM dans la solution A.

D = TBHP (Sigma,  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$ ) : tert - butylhydroperoxyde; 0,4 mM

dans une solution eau/éthanol (3/1).

E = Glutathion réductase pure, 217 U/ml(Sigma).

F = Mixture comprenant A/B/C/E dans un rapport 8 ml, 1 ml, 1 ml, 50 $\mu$ l, gardée à 0° C, préparée juste avant l'emploi.

G = Sang de boeuf dilué 100 fois dans du PBS.

##### b. Méthode pour un simple dosage de la glutathion peroxydase.

- Prendre 0,4 ml de F.

- Ajouter 0,1 ml de G.

- Incuber pendant 5 min.

- Ajouter 0,1 ml de D.

- Lire au spectrophotomètre (Perkin-Elmer, 557 Double beam Spectrophotometer) à 366 nm pendant 1 min 30 sec à 25° C, échelle de densité optique 0,05; vitesse de déroulement du papier 6 cm/min.

- L'activité se calcule ensuite grâce à la formule suivante :

$$\frac{\text{D.O./min} \times 10 \times \text{dil.}}{6,22 \times 1,667} \quad \mu\text{moles min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

avec une Unité = une  $\mu$ mole de NADPH oxydé/min à 25° C.

c. Méthode suivie pour réaliser les courbes d'inhibition avec les anticorps.

- Incubation de 200  $\mu$ l de G avec 200  $\mu$ l d'anticorps de concentration désirée pendant 10 min = solution H.
- Prendre 0,4 ml de F.
- Ajouter 0,1 ml de H.
- Incuber 5 min.
- Ajouter 0,1 ml de D.
- Lire au spectrophotomètre à 366 nm, mêmes paramètres que ci-dessus.

d. Remarques.

d.1. Pour certains dosages, nous avons remplacé le TBHP par une solution de  $H_2O_2$  30 % à 0,3mM dans du PBS.

d.2. Nous avons également réalisé des expériences d'inhibition de la glutathion peroxydase à partir de surnageants de fibroblastes humains ou de chondrocytes bovins. Pour obtenir des surnageants, les cellules sont raclées à raison de 1 ml de PBS / boîte (Falcon, 75 cm<sup>2</sup>), homogénéisées au Dounce tight et centrifugées à 39000 RPM, pendant 30 min., à 0° C (BECKMANN L2 65B, rotor de type 40). 200  $\mu$ l de surnageant ainsi obtenus étaient incubés en présence de 50  $\mu$ l de la dilution voulue d' anticorps, également pendant 10 min. La suite de la manipulation demeure inchangée.

d.3. Chaque expérience de dosage, aussi bien sur le sang que sur les surnageants, tant avec le TBHP qu'avec l' $H_2O_2$  a été réalisée avec un contrôle constitué par un autre anticorps monoclonal dirigé contre des

protéines membranaires, cela afin d'être certain de n'avoir aucune interférence due simplement aux anticorps et non pas au fait qu'ils soient dirigés contre l'enzyme. Chaque fois ce contrôle s'est révélé négatif; nous en avons donc conclu que l'inhibition observée était bien due à la fixation de l'anti-Gpx sur la glutathion peroxydase, ce qui provoque une diminution de l'activité de l'enzyme.

## 5. DOSAGE DE LA CATALASE.

### a. Solutions.

A = albumine (Boserol, Organon Teknica).

B = Tampon-imidazol HCl 0,2 M pH 8.

C = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (Merck).

D = Triton X 100, 2 %.

E = Oxysulfate de Titane dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (1,7 g d'oxysulfate de Titane (Merck) dans 500 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, faire bouillir 10 min sur agitateur, refroidir, reporter à 500 ml avec H<sub>2</sub>O, ajouter 250 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, filtrer sur 4 filtres plissés, Wathman n°2).

F = Solution contenant 500 mg albumine (A), 50 ml imidazol (B) et 450 ml H<sub>2</sub>O, laissée à 20° C.

G = idem + 0,08 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C), laissée à 20° C.

H = Catalase (Sigma) diluée 500 x 10<sup>3</sup> fois.

### b. Méthode.

- Prendre 0,1 ml de H.

- Ajouter 0,1 ml de D.

- Ajouter 5 ml de F pour les blancs  
5 ml de G pour les tests de 20 sec en 20 sec.
- Incuber 45 min.
- Fixer avec 3 ml de E.
- Lire à 420 nm au spectrophotomètre (Zeiss, West Germany, Spectrophotometer PM6).
- Faire un blanc blanc et un blanc substrat. Les unités/ml se calculent par la formule suivante :

$$\frac{\log \text{Ext bl. substrat}}{\text{Ext test}} \times \frac{5,2 \times \text{dil.}}{0,1 \times 45 \times 50}$$

c. Méthode utilisée pour réaliser les courbes d'inhibition avec les anticorps.

c.1. Sur l'enzyme pure.

- Incuber 0,1 ml d'enzyme et 0,1 ml de chaque dilution d'anticorps pendant 20 min.
- Ajouter 5 ml de F pour les blancs  
5 ml de G pour les tests toutes les 20 sec.
- Incuber pendant 45 min.
- Fixer par 3 ml de E.
- Lire à 420 nm.

c.2. Sur des surnageants ou des culots remis en suspension.

Le surnageant est obtenu par raclage des cellules, homogénéisation et centrifugation à 39000 RPM. Mais cette centrifugation fait sédimenter les peroxysomes dans lesquels se trouve la catalase.

Certaines expériences de dosage de cette enzyme ont donc été effectuées sur le culot ainsi recueilli et remis en suspension dans du PBS.

- Incuber 0,1 ml de surnageant ou de culot et 0,1 ml de D.
- Ajouter 50 µl de la dilution voulue d'anticorps.
- Attendre 20 min.
- La suite de la manipulation est identique.

#### d. Remarque

Le même contrôle que pour la glutathion peroxydase a été effectué.

## D. MICROINJECTION.

### 1. LA CULTURE DE CELLULES.

#### a. Culture de fibroblastes.

##### a.1. Solutions.

T = trypsine 0,25 % dans un tampon Tris.

M = milieu de culture composé de milieu minimum essentiel de Eagle, des sels de Earle, de 50 mg/l d'auréomycine et de 2,2 g/l de  $\text{NaHCO}_3$ . Le pH du milieu est ajusté à pH 7,4.

M + S = M contenant 10 % de sérum de veau foetal (FCS).

Les produits sont fournis par Eurobio (Paris, France).

## a.2. Méthode.

On procède à une sous-culture d'une boîte Falcon de 75 cm<sup>2</sup> dans laquelle les fibroblastes humains WI-38 obtenus de l'American Type culture Collection sont arrivés à confluence :

- Préchauffer à 37° C dans l'étuve le milieu M, le milieu M + S et la trypsine T.
- Décanter l'ancien milieu.
- Rincer la boîte avec 10 ml de M durant 2 min.
- Ajouter 2 ml de T et laisser à température ambiante pendant 2 min.
- Décanter la trypsine et placer la boîte à l'étuve à 37° C pendant environ 20 min afin que les cellules se détachent de la paroi.
- Ajouter 10 ml de M + S et resuspendre les fibroblastes.
- Ajouter 30 ml de M + S. Mélanger délicatement et prélever 20 ml à placer dans une autre boîte Falcon.
- Insuffler un gaz contenant 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air et refermer la boîte.
- Les boîtes sont placées dans une étuve à 37° C.

## b. Culture de chondrocytes.

### b.1. Solutions.

M = milieu de Dulbecco (Gibco).

T = voir fibroblastes (solutions).

TE = trypsine contenant de l'EDTA 5,4mM.

O = milieu Optimem contenant 5 % de sérum de veau foetal et ajouter 1 ml de glutamine (200mM), 1 ml de pyruvate (100mM), 100 µl de

mercaptoéthanol (50mM), 1 ml de streptomycine (1µg/ml) pour 100 ml de milieu.

#### b.2. Méthode.

Les chondrocytes ont été mis en culture à partir de cartilage bovin par M. Raes et I. Knott (non publié).

- Préchauffer dans l'étuve à 37° C M, T, TE et O.
- Décanter l'ancien milieu.
- Rincer deux fois avec 10 ml de M pendant 2 min.
- Ajouter 2 ml de TE et laisser à température ambiante pendant 1 min 30 sec.
- Décanter TE.
- Ajouter 2 ml de T et laisser à température ambiante pendant 1 min 30 sec.
- Décanter T.
- Ajouter 10 ml de O et resuspendre les cellules à l'aide d'une pipette pasteur.
- Ajouter 30 ml de O. Mélanger délicatement et prélever 20 ml à placer dans une autre boîte Falcon.
- Insuffler un gaz contenant 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air et refermer la bouteille.
- Les boîtes sont placées dans une étuve à 37° C.

Remarque: changement de milieu de culture : après quelques jours, il faut réapprovisionner les cellules en éléments nutritifs; pour ce faire, il faut décanter l'ancien milieu et ajouter 15 ml de M + S pour les fibroblastes ou 15 ml de O pour les chondrocytes.

### c. Culture en vue de la microinjection.

Pour la microinjection, nous avons utilisé des petites boîtes de Pétri (Falcon, 60 X 15 mm) que nous avons quadrillées. Le quadrillage permet de repérer chaque cellule et d'éviter son passage d'un compartiment à l'autre. Lors d'un repiquage, une à deux gouttes d'une suspension cellulaire d'une boîte Falcon de 75 cm<sup>2</sup> sont ajoutées à l'une de ces petites boîtes en présence de 2,5 ml de milieu O. La densité obtenue est ainsi d'environ 0,6 cellule/mm<sup>2</sup>. Les cellules sont alors conservées pendant 24 heures dans une étuve à CO<sub>2</sub> à 37° C pour leur permettre de s'attacher et sont utilisées par la suite pour être microinjectées.

## 2. LA MICROINJECTION.

### a. Technique.

La technique de microinjection d'une solution d'enzyme dans les fibroblastes a été mise au point par V. Henin (1981) selon un système décrit par Ansorge (1982), méthode développée par Graessman *et al.* (1980). Nous avons suivi la même technique pour injecter les chondrocytes.

Il s'agit de fabriquer des micropipettes de diamètre suffisamment petit pour percer la membrane plasmique sans léser la cellule et, d'injecter ainsi une solution directement à l'intérieur de la cellule. Pendant l'injection, le milieu de culture est remplacé par la solution de Puck (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 160 mg/l, KCl 400mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 mg/l, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 154 mg/l, NaCl 8 mg/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 290 mg/l, glucose 1100 mg/l, pH 7,2) dépourvue de bicarbonate.

Les cellules sont ensuite rincées délicatement deux fois au PBS contenant 1000 U/ml de pénicilline et 1 mg/l de streptomycine (Gibco) en vue

d'éviter toute contamination ultérieure, puis replacées dans le milieu Optimem + 5 % de sérum de veau foetal à 37° C, dans une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### b. Solutions injectées.

Deux types de solutions ont été injectées : d'une part les anticorps à une concentration de 1 mg/ml et d'autre part, un tampon d'injection (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 5,45 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,55 mM; KCl 70,5 mM; NaCl 7,05 mM; pH 7,2) afin d'obtenir une estimation de la proportion des cellules qui meurent suite à la manipulation. Il faut également ajouter que le volume injecté grâce à cette technique est d'environ 10<sup>-11</sup> ml par cellule (V. Henin, 1981).

#### c. Observation des cellules injectées.

Une trentaine de chondrocytes ont été injectés avec les anticorps; deux autres séries de cellules servent de témoins : l'une n'ayant subi aucune injection, l'autre ayant été injectée avec du tampon d'injection. Afin d'éviter la variabilité de boîte en boîte, due aux différentes manipulations soit pendant le repiquage, soit pendant la microinjection, ces trois groupes de chondrocytes se trouvent dans la même boîte de Pétri. Les cellules de chaque groupe sont examinées et comptées individuellement chaque jour pendant une semaine. Un éventuel effet de la solution injectée pouvait ainsi être mis en évidence.

## Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.

### A. LES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA CATALASE.

#### INTRODUCTION.

La catalase est une enzyme tétramérique. Chacune de ses sous-unités a un poids moléculaire de 60000 daltons. On la trouve principalement dans les peroxysomes mais également dans le cytosol. C'est une enzyme essentielle dans le métabolisme cellulaire en ce sens qu'elle transforme le peroxyde d'hydrogène, produit toxique de la respiration cellulaire et de l'activité de certaines oxydases telles que la superoxyde dismutase. Elle catalyse la réaction suivante :



Comme indiqué dans l'introduction, la dismutation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  permet de diminuer la production secondaire de OH.

La catalase est une enzyme bien connue depuis de nombreuses années; Sevag en 1934, par exemple, avait déjà montré que l'addition de catalase dans le milieu de respiration de pneumocoques acatalasémiques pouvait, en prévenant l'accumulation d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  résultant de la respiration, éviter l'inhibition de cette respiration et la perte de viabilité des bactéries.

Nous voulions dans ce travail préparer des anticorps monoclonaux dirigés contre la catalase et les injecter dans les cellules afin de pouvoir tester l'effet de leur action d'inhibition sur le comportement cellulaire.

L'immunisation et la fusion se sont déroulées telles qu'elles sont décrites dans Matériels et Méthodes. Sept boîtes (Sterilin Flow) de 96 puits ont pu être constituées. Les clones vivants ont été comptés 2 semaines après la fusion : il y en avait 89. On a, par la suite, réalisé un test ELISA pour vérifier leur qualité de producteurs d'anticorps anti-catalase : 20 y répondaient. Parmi ces 20 clones, 14 induisaient une inhibition de l'activité de l'enzyme.

Nous en avons choisi trois pour les injecter à des souris et obtenir des ascites. Ces trois clones étaient dénommés :

- 7E11D6
- 7E11C8a
- 7E11C8b

Pour des raisons de facilité, nous garderons ces dénominations pour désigner les différents anticorps.

#### CARACTERISATION.

Après les avoir purifiés, concentrés et dialysés, nous avons entrepris de les caractériser. Cette caractérisation inclut la détermination de leur concentration, de leur classe, de leur titre et l'estimation de leur pouvoir d'inhibition sur l'enzyme.

## 1. LA CONCENTRATION.

Nous l'avons déterminée selon la méthode de Lowry *et al.* :

Anticorps	Concentration (mg/ml)
7E11D6	2,88
7E11C8a	3,27
7E11C8b	2,04

## 2. LA CLASSE.

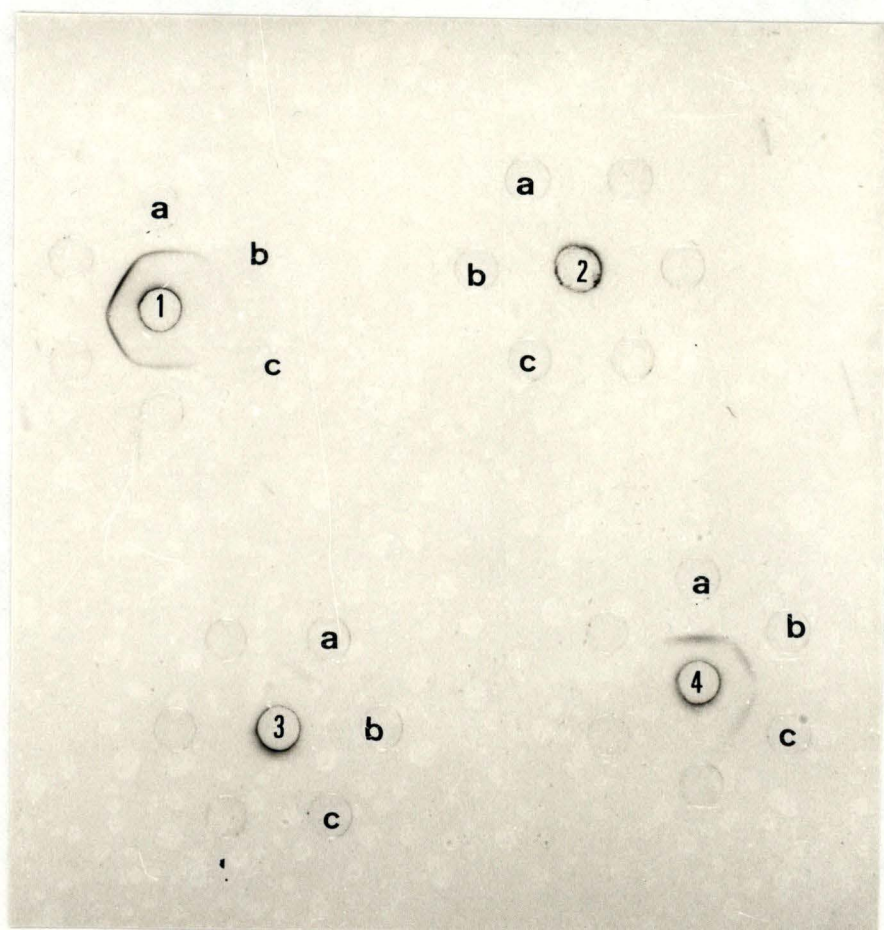
Nous disposons d'anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b contre lesquels nous avons fait diffuser nos anticorps. L'immunodiffusion, en plus de nous renseigner sur la classe de nos anticorps, nous permet de restreindre les doutes éventuels quant à leur monoclonalité sans pour autant nous en donner la preuve. En effet, il se peut que nous soyons en présence de deux immunoglobulines de la même classe ou plus; dans ce cas l'immunodiffusion ne nous permettra pas de les distinguer.

Les résultats de la diffusion de nos anti-catalase contre les anti-Ig de souris sont présentés à la figure 6.

De ces résultats, on peut conclure que, si à l'évidence les anticorps 7E11C8a et 7E11C8b n'appartiennent qu'à une seule classe, à savoir celle des IgG2a, par contre, les 7E11D6 sont, quant à eux, sûrement polyclonaux puisque on peut distinguer deux arcs de précipitation les concernant : les anticorps issus de ce clone appartiennent à la fois à la classe des IgG1 et des IgG2a.

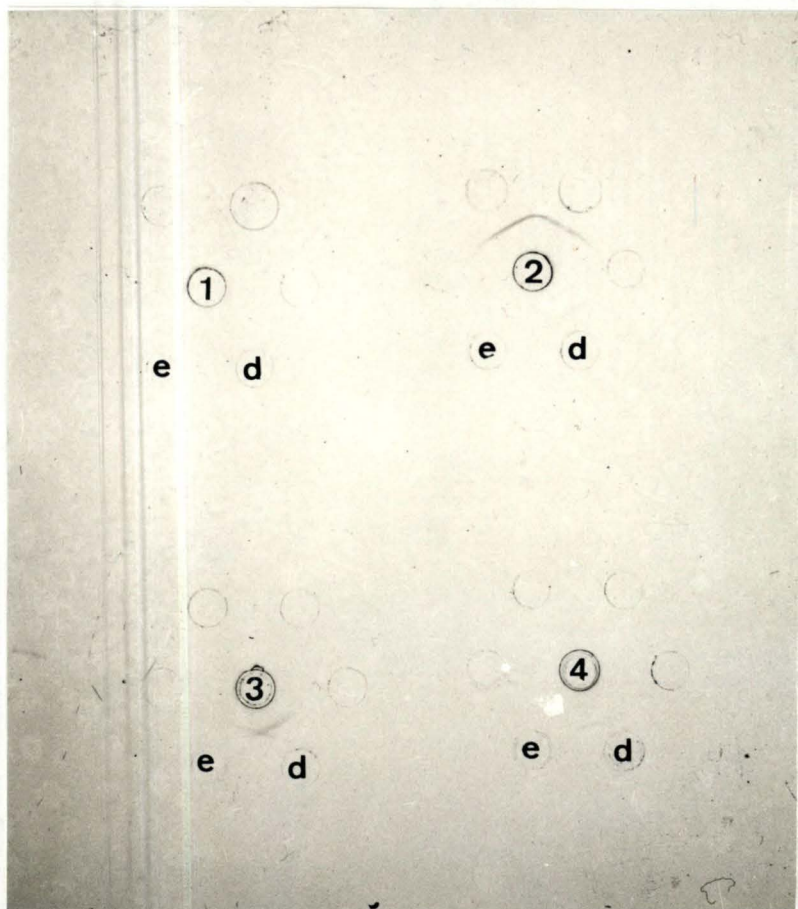
FIGURE 6

Plaques d'immunodiffusion permettant de déterminer la classe des trois préparations d'anticorps anti-catalase.



1 = anti-IgG1  
 2 = anti-IgM  
 3 = anti-IgG2b  
 4 = anti-IgG2a

a = 7E11D6, 290  $\mu\text{g/ml}$   
 b = 7E11D6, 58  $\mu\text{g/ml}$   
 c = 7E11D6, 29  $\mu\text{g/ml}$



- 1 = anti-IgM
- 2 = anti-IgG 1
- 3 = anti-IgG2a
- 4 = anti-IgG2b

d = 7E11C8a, 330 µg/ml  
e = 7E11C8a, 55 µg/ml

- 1 = anti-IgM
- 2 = anti-IgG 1
- 3 = anti-IgG2a
- 4 = anti-IgG2b

f = 7E11C8b, 200 µg/ml  
g = 7E11C8b, 33 µg/ml



Plusieurs hypothèses se présentent pour expliquer ce fait :

- Le clone 7E11D6, ayant été dilué de façon limitante, nous pouvons dès lors supposer que, lors de la fusion, deux lymphocytes ont fusionnés avec une cellule myélomateuse.

- Il peut également s'être produit un réarrangement chromosomique amenant la production de deux immunoglobulines différentes.

- Deux cellules hybrides ont pu croître l'une à côté de l'autre, ne laissant apparaître qu'un seul clone.

- Enfin on peut également supposer une erreur de sous-clonage.

Cependant, ces anticorps étant biclonaux, ils ne trouvaient plus leur place dans notre travail; nous les avons donc écartés et nous avons poursuivi nos recherches sur 7E11C8a et 7E11C8b.

### 3. LE TITRE.

Il a été déterminé par ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Cette technique permet de déterminer la dilution maximale à laquelle on peut encore observer un résultat positif. On peut exprimer l'activité spécifique d'un anticorps en divisant le titre obtenu par la concentration. Le titre est ici supérieur à  $10^4$ , comme le montrent les figures 7 et 8. Par extrapolation des courbes, nous obtenons les résultats suivants :

	Titre	Concent. (mg/ml)	Act. sp. (Unités)
7E11C8a	29800	3,27	9130
7E11C8b	29800	2,04	14600

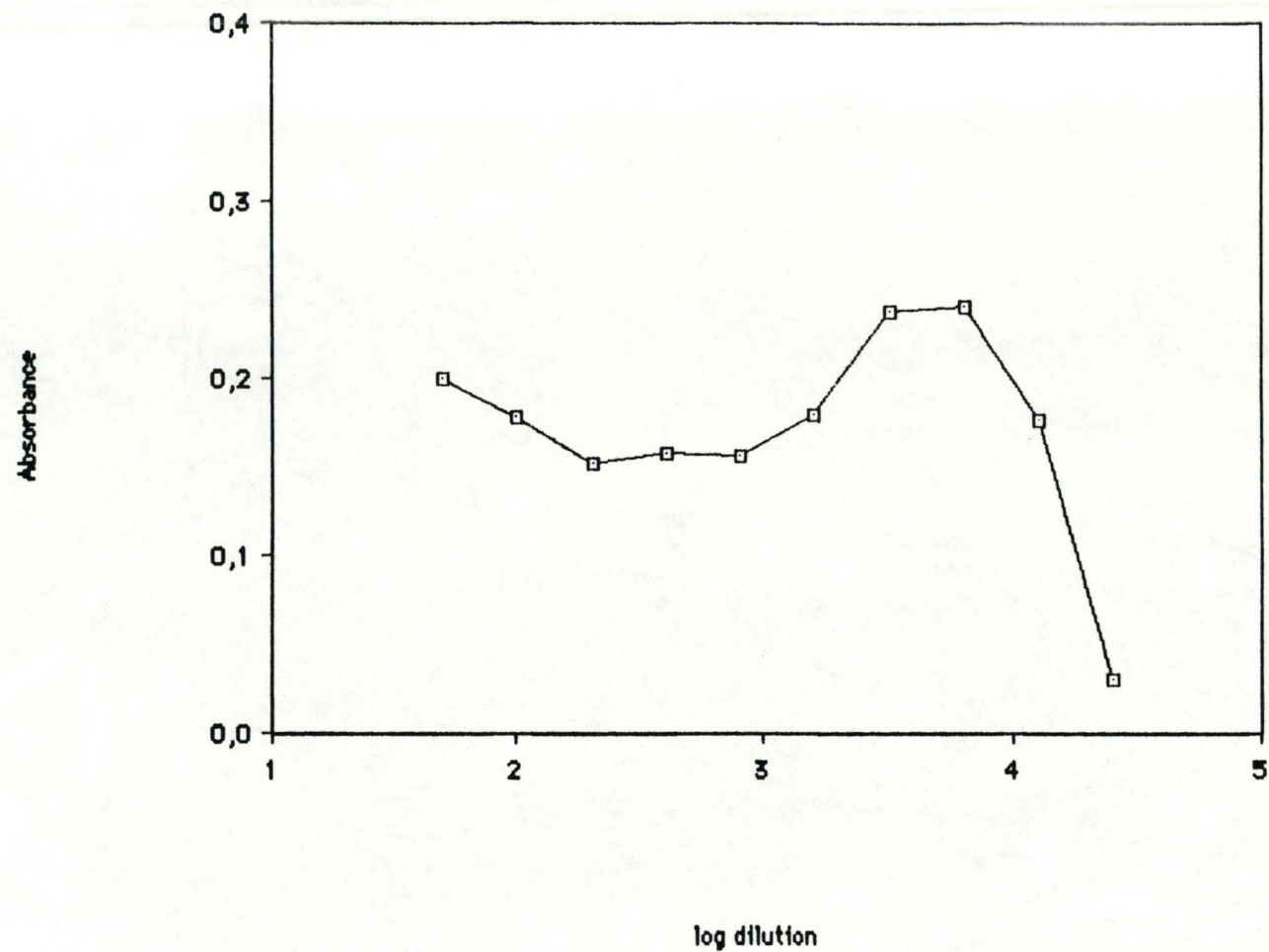


FIGURE 7

Test ELISA réalisé sur les anticorps anti-catalase 7E11C8a.

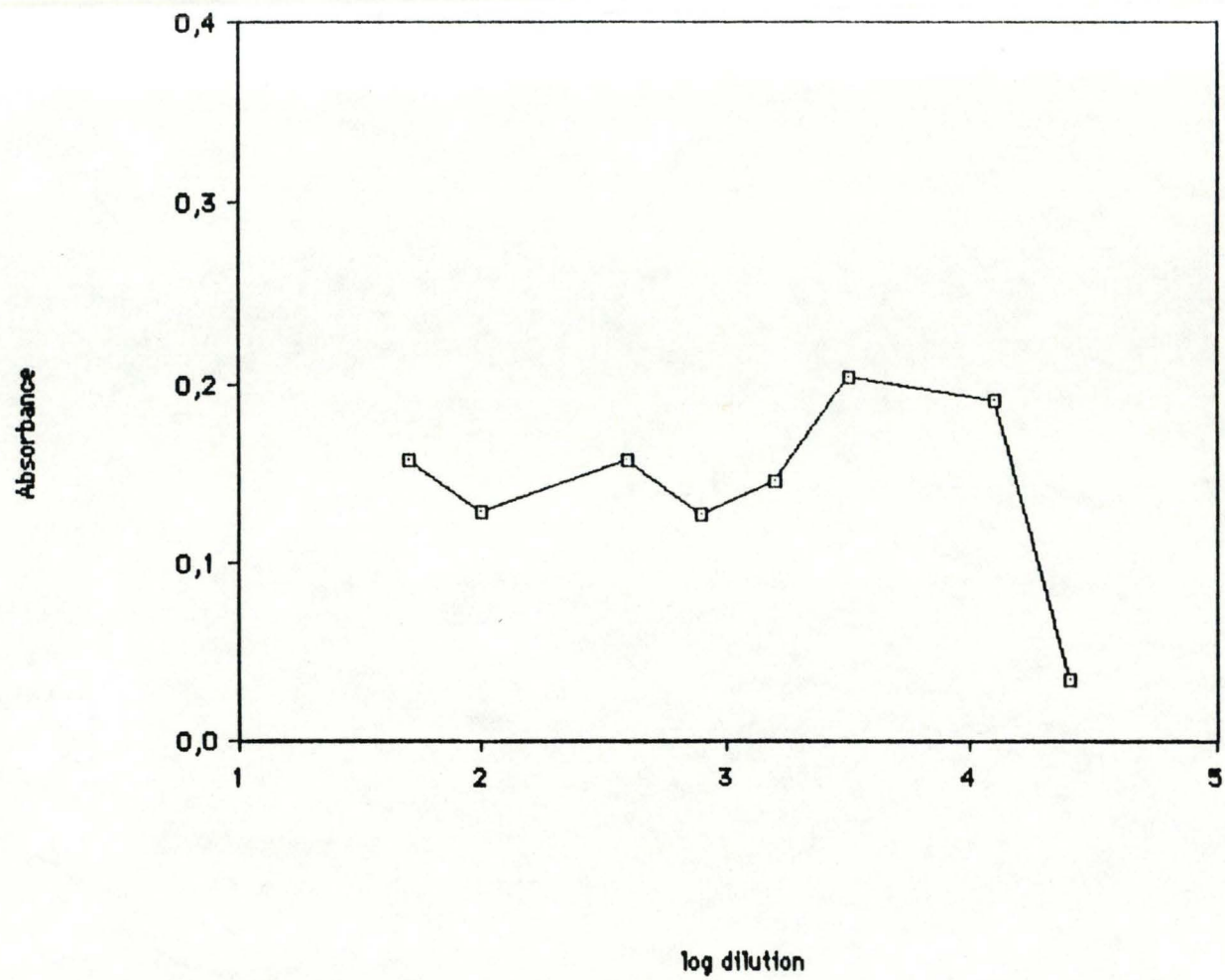


FIGURE 8

Test ELISA réalisé sur les anticorps anti-catalase 7E11C8b.

Les deux anticorps se fixent donc bien sur leur antigène; maintenant, il reste à savoir s'ils auront une quelconque influence sur l'activité de la catalase.

#### 4. COURBES D'INHIBITION.

##### a. Inhibition de l'enzyme pure.

Une première série d'expériences consistait à mettre en évidence l'inhibition de la catalase pure par les anticorps.

Ces tests ont été réalisés comme décrits dans Matériels et Méthodes (pages 31 à 33). Les résultats sont présentés aux figures 9 et 10.

L'inhibition de l'anticorps 7E11C8a est peu évidente, et, si elle existe, elle est très faible; celle obtenue avec 7E11C8b est, elle, plus élevée et pourrait se situer aux environs de 20 %.

L'inhibition d'une enzyme par des anticorps est en général due à un effet stérique limitant l'accessibilité du site actif de l'enzyme au substrat. Nous avons ici un substrat très petit ( $H_2O_2$ ) et il est donc compréhensible que l'inhibition soit difficile à obtenir.

Signalons en passant une très belle courbe d'inhibition de la catalase obtenue avec des anticorps monoclonaux contrôles dirigés contre un antigène d'histocompatibilité, et aimablement fournis par le Dr J.J. Letesson (figure 11). Après vérification, nous avons constaté que cette inhibition était due à la présence d'azide à 0,1 % dans la préparation.

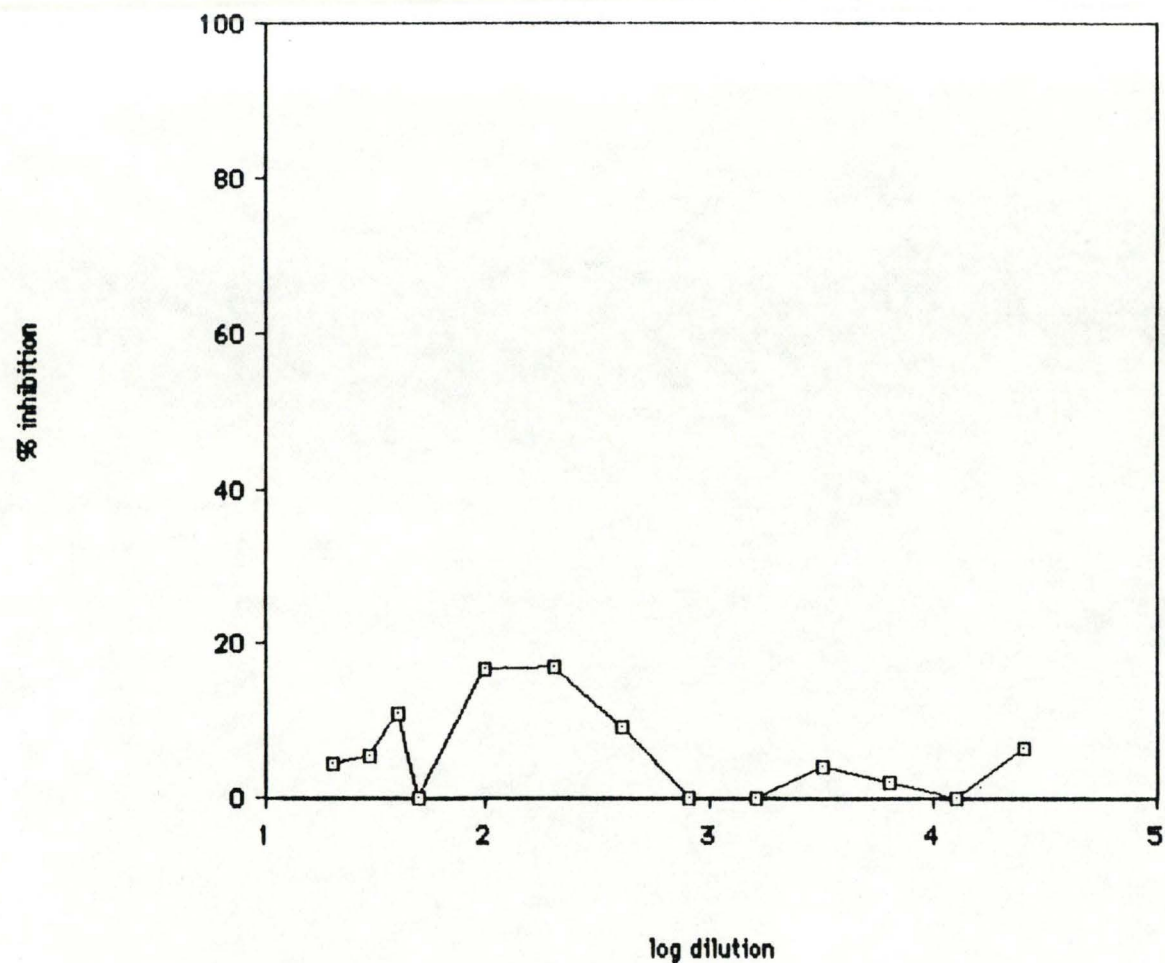


FIGURE 9

La catalase pure a été incubée en présence des anticorps 7E11C8a préparés à des dilutions croissantes. L'action de l'anticorps est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle qui ne contenait pas d'anticorps.

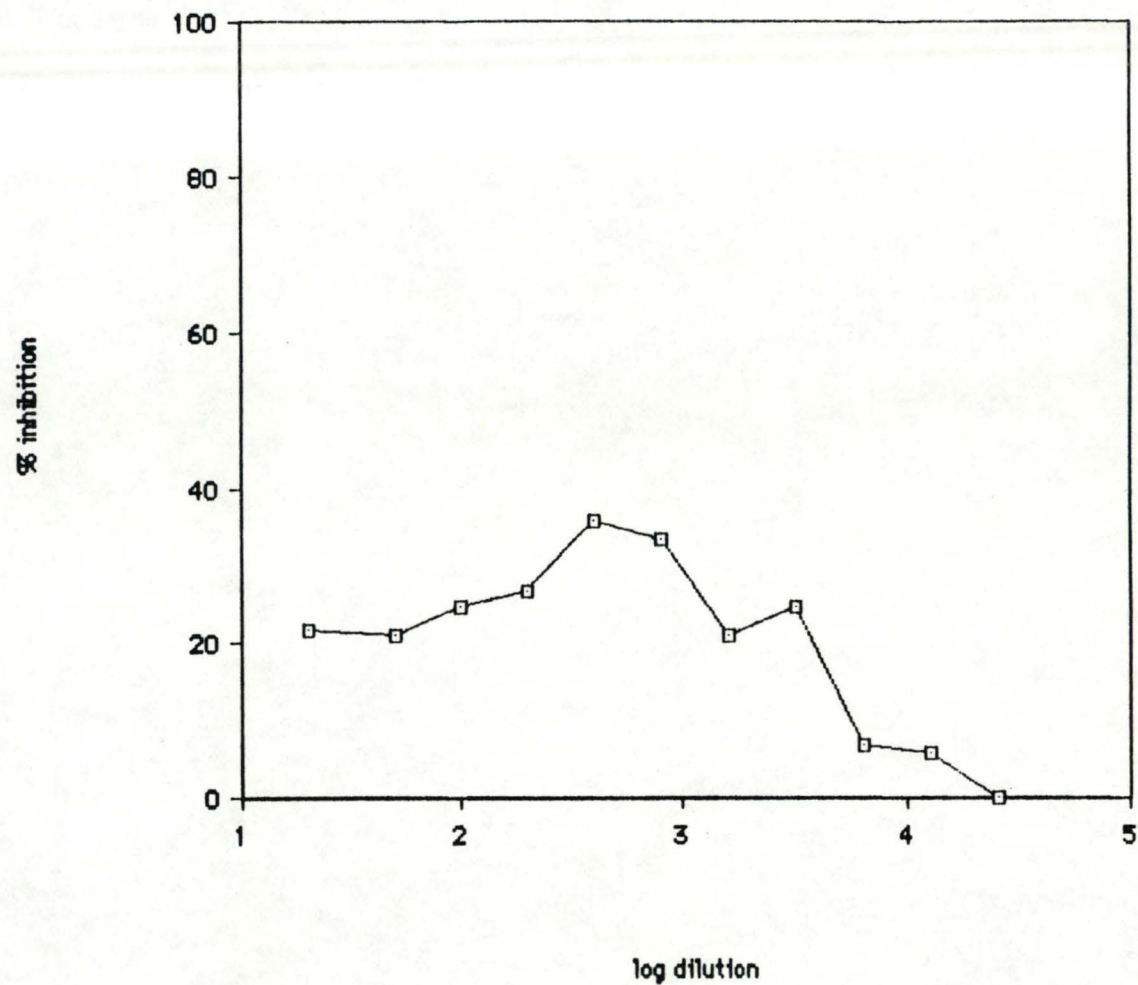


FIGURE 10

La catalase pure a été incubée en présence des anticorps 7E11C8b préparés à des dilutions croissantes. L'action de l'anticorps est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle qui ne contenait pas d'anticorps.

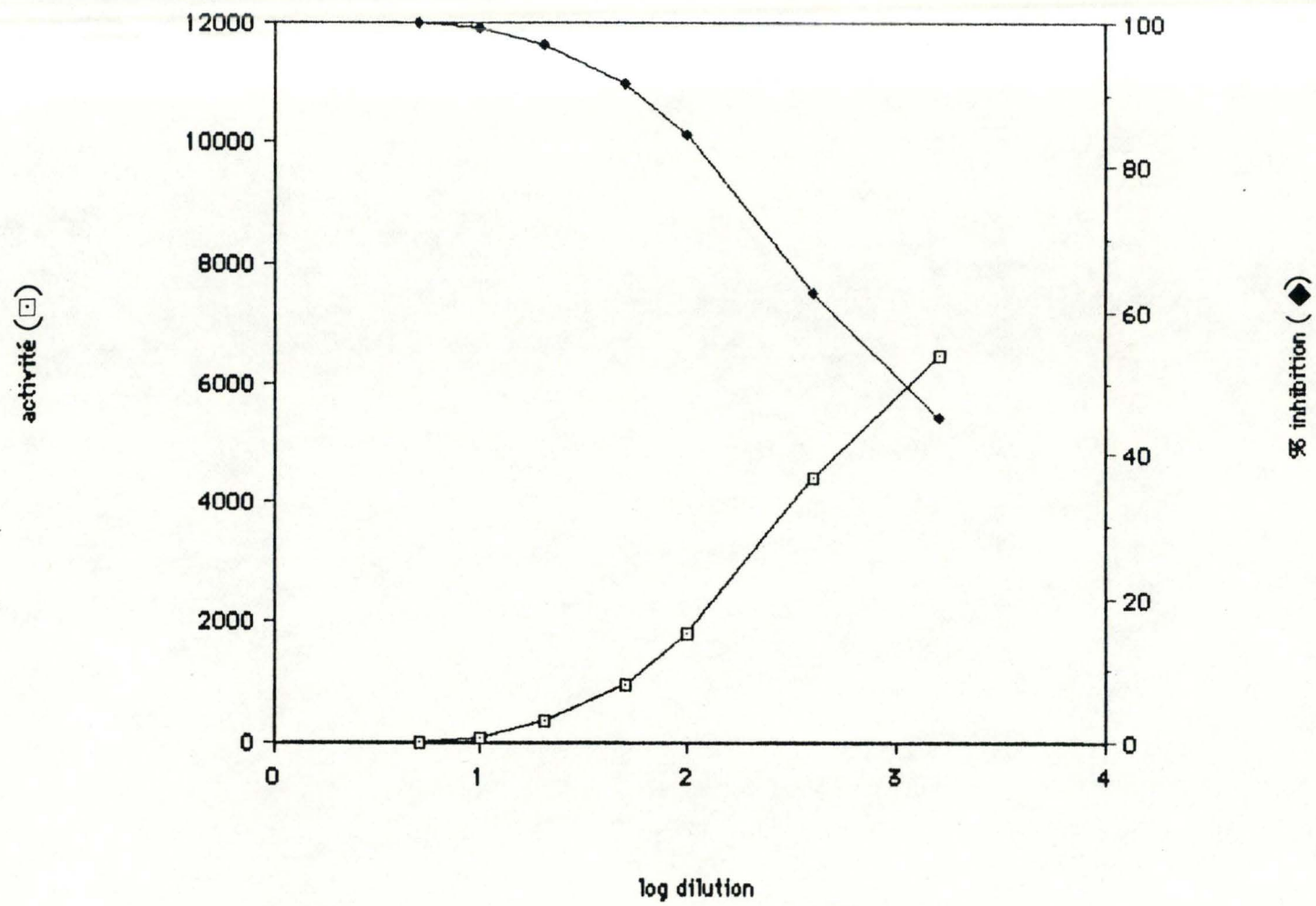


FIGURE 11

Effet de l'inhibition de la catalase pure en présence d'une préparation d'anticorps contre des protéines d'histocompatibilité, mais contenant 0,1 % d'azide. L'inhibition observée est due à la présence d'azide.

b. Inhibition de la catalase du surnageant de chondrocytes bovins et de fibroblastes humains.

Tant sur des chondrocytes bovins cultivés pendant quelques générations ou non cultivés que sur des fibroblastes humains, les anticorps ne montraient pas d'inhibition de l'activité enzymatique. Cette activité était cependant faible (voir Tableau I), la quantité d'anticorps était donc très certainement en excès. Il y a très peu de catalase dans le cytoplasme, et les organites qui contiennent la majeure partie de l'enzyme, les peroxysomes, ne se trouvent plus dans le surnageant récolté puisqu'il a été centrifugé à 39000 RPM pendant 30 min, ces conditions entraînant la sédimentation des peroxysomes (voir Matériels et Méthodes).

Nous avons donc voulu voir comment se comportait la catalase présente dans les peroxysomes en testant les anticorps sur le culot.

c. Inhibition de la catalase des organites subcellulaires.

Les culots mentionnés ci-dessus présentaient bien une activité plus importante de la catalase (voir Tableau I), surtout chez les chondrocytes bovins. Sur ces préparations, on peut observer une certaine inhibition de l'activité, aussi bien de la catalase de chondrocytes bovins que de celle de fibroblastes humains (voir Tableau I). On peut donc en déduire que les deux catalases, bovine et humaine, ont conservé des épitopes identiques puisque les anticorps diminuent leur activité de manière semblable.

Cependant, l'inhibition, qui se manifeste aussi bien pour 7E11C8a que pour 7E11C8b, n'excède pas 10 %, ce qui est très faible.

Tableau I :

\* Des chondrocytes frais sont des chondrocytes prélevés directement sur le cartilage et non cultivés.

\*\* Les surnageants et culots sont obtenus après centrifugation des cellules dans du PBS à 39000 RPM pendant 30'.

	enzyme pure	surnageant ** de chondrocytes frais *	surnageant de chondrocytes cultivés	surnageant de fibroblastes humains	culot ** de chondrocytes cultivés	culot de fibroblastes humains
Protéines						
- mg/ml	$1,9 \cdot 10^{-4}$	/	/	/	/	/
- $\mu\text{g}/10^6$ cell.	/	56,58	88,46	118,78	55,42	24,38
Activité :						
- Unités/ml	11560	/	/	/	/	/
- Unités/ $10^6$ cell.	/	$3,791 \cdot 10^{-5}$	$4,263 \cdot 10^{-5}$	$2,044 \cdot 10^{-5}$	$1,049 \cdot 10^{-3}$	$3,525 \cdot 10^{-4}$
% d'inhibition de	<i>dil</i> 1/5	<i>dil</i> 1/25	<i>dil</i> 1/25	<i>dil</i> 1/25	<i>dil</i> 1/25	<i>dil</i> 1/25
- 7E11C8a	0 à 10	0 à 5	0 à 5	0 à 5	5 à 10	1 à 5
- 7E11C8b	20 à 30	0 à 5	0 à 5	0 à 5	5 à 10	5 à 10

Comment se fait-il, pourtant, que l'on n'observe pas d'inhibition de la catalase du surnageant si faible soit-elle ? Nous avons postulé ici deux hypothèses :

- il peut y avoir une modification de la catalase du surnageant par rapport à celle des peroxysomes. En effet, étant dans des conditions différentes, l'une isolée dans l'enceinte fermée que constitue le peroxysome, l'autre libre dans le cytoplasme, les deux enzymes peuvent avoir évolué de manière légèrement différente.

- il se peut également que la catalase du surnageant soit protégée par d'autres constituants du cytoplasme.

*Remarque* : Par comparaison entre les chondrocytes frais (non cultivés) et les chondrocytes cultivés, ces expériences montrent une augmentation de la quantité de protéines chez les cellules cultivées, ceci étant probablement dû aux conditions artificielles dans lesquelles elles se trouvent. En culture, les cellules se divisent activement et synthétisent donc plus de constituants que lorsqu'elles se trouvent dans leur tissu d'origine. Quant à la catalase, sa quantité reste du même ordre de grandeur.

A la suite de ces expériences, il s'avérait peu intéressant d'utiliser les anticorps monoclonaux dirigés contre la catalase pour la microinjection, d'abord parce que l'inhibition observée était très faible (de 5 à 20 %), et ensuite parce que les anticorps injectés dans le cytoplasme n'auraient pas traversé la membrane des peroxysomes, et n'auraient donc eu aucun effet sur l'activité de la catalase des peroxysomes qui est la plus importante dans ces cellules.

### Conclusion.

Les anticorps anti-catalase se fixent effectivement bien sur leur antigène (vu par ELISA), cependant leur efficacité à inhiber l'activité de l'enzyme est faible, cela étant dû probablement à la petitesse du substrat, le peroxyde d'hydrogène.

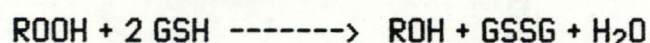
De plus, leur incapacité à traverser la membrane des peroxysomes les aurait rendus inefficaces dans la cellule. Ils s'avéraient donc peu utiles pour les expériences de microinjection.

## B. LES ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA GLUTATHION PEROXYDASE.

### INTRODUCTION.

La glutathion peroxydase est une enzyme tétramérique. Chacune de ses sous-unités a un poids moléculaire de 21000. Son site actif comprend un atome de sélénium. On la trouve dans le cytoplasme et dans la matrice mitochondriale (Flohé, 1982).

Elle catalyse la réaction suivante :



Elle joue de ce fait plusieurs rôles primordiaux dans la cellule :

- elle diminue les dommages causés par le peroxyde d'hydrogène en le détoxifiant. Elle complète donc l'action de la catalase.

- elle maintient l'intégrité des membranes biologiques en réduisant les hydroperoxydes formés suite à l'attaque des radicaux libres. En effet, Flohé (1982) a pu montrer qu'une déficience en glutathion peroxydase facilitait les lésions au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins, diminuait la formation de  $\text{PGI}_2$  et entraînait le vieillissement prématuré des globules rouges.

- elle prévient la mutagenèse chimique créée par les peroxydes (Flohé, 1979).

- elle intervient dans la cascade de l'acide arachidonique menant aux prostaglandines (Flohé, 1979).

La glutathion peroxydase est spécifique pour le substrat donneur d'électrons qu'est le glutathion, mais non spécifique quant aux hydroperoxydes réduits.

On a pratiqué l'immunisation et la fusion telles qu'elles sont décrites dans Matériels et Méthodes. Suite à la fusion, nous avons pu remplir 5 boîtes de 96 puits. On a alors attendu 2 semaines avant de dénombrer les clones qui poussaient : il y en avait 380. Ceux-ci ont été testés (ELISA) 10 jours plus tard afin de vérifier leur fixation sur l'enzyme : 18 clones étaient positifs. Ensuite, après une semaine, on a contrôlé leur pouvoir d'inhibition sur l'activité de la glutathion peroxydase : 5 se sont révélés efficaces.

Parmi ces 5 clones, 4 ont été choisis pour être injecter à des souris de manière à produire des ascites et une grande quantité d'anticorps. Nous avons étudié ces 4 types d'anticorps qui étaient issus des clones :

- 1E7B12a
- 1E7B3
- 1E7C10
- 1E7B12b.

#### CARACTERISATION.

Une fois purifiés et concentrés, nous avons entrepris de caractériser ces anticorps en déterminant, comme pour les anti-catalase, leur concentration, leur classe, leur titre et leur pouvoir d'inhibition sur l'enzyme.

## 1. LA CONCENTRATION.

Leur concentration a été déterminée la méthode de Lowry *et al.* (1951). Elle était de :

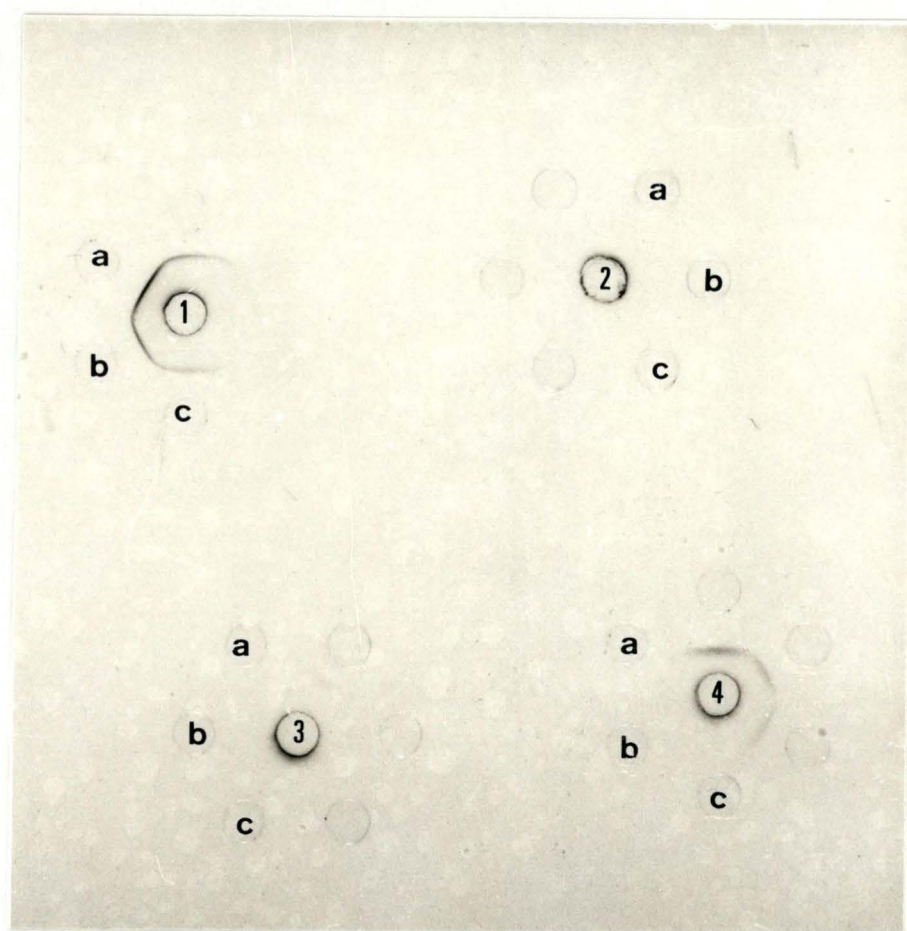
Anticorps	Concentration (mg/ml)
1E7B12a	4,27
1E7C10	1,09
1E7B3	0,76
1E7B12b	1,30

## 2. LA CLASSE.

Les résultats de l'immunodiffusion des quatre anticorps réalisée contre des anti-IgM, des anti-IgG1, des anti-IgG2a et des anti-IgG2b sont présentés à la figure 12. Ils indiquent clairement que tous les anticorps anti-glutathion peroxydase sont des IgG1, et que tous n'appartiennent qu'à une seule classe d'immunoglobulines. Ceci est une indication que chacun d'eux est issu d'un seul clone et est donc dirigé contre un seul déterminant antigénique.

FIGURE 12

Plaques d'immunodiffusion permettant de déterminer la classe des quatre préparations d'anticorps anti-glutathion peroxydase.



1 = anti-IgG1  
 2 = anti-IgM  
 3 = anti-IgG2b  
 4 = anti-IgG2a

a = 1E7B12a, 430  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
 b = 1E7B12a, 86  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
 c = 1E7B12a, 43  $\mu\text{g}/\text{ml}$

d f  
e 1 g  
e 2 g

1 = anti-IgM  
2 = anti-IgG1  
3 = anti-IgG2a  
4 = anti-IgG2b

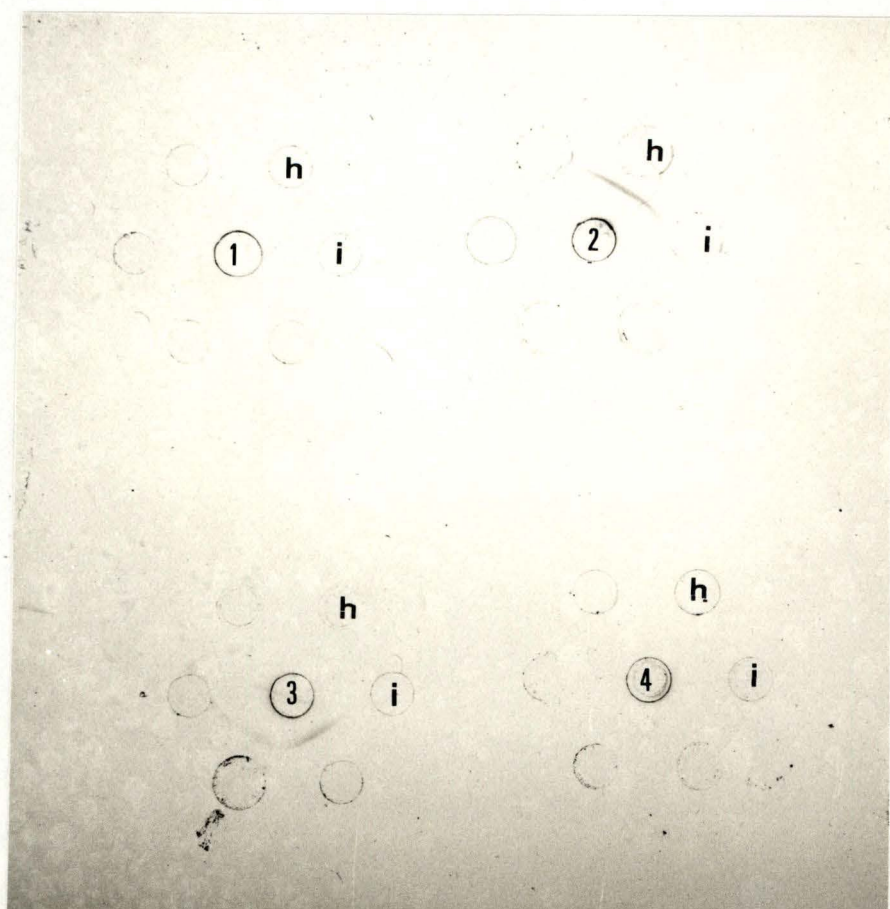
d = 1E7C10, 110  $\mu\text{g/ml}$   
e = 1E7C10, 18  $\mu\text{g/ml}$

d f  
e 3 g  
e 4 g

f = 1E7B3, 76  $\mu\text{g/ml}$   
g = 1E7B3, 13  $\mu\text{g/ml}$

1 = anti-IgM  
2 = anti-IgG1  
3 = anti-IgG2a  
4 = anti-IgG2b

h = 1E7B12b, 130  $\mu\text{g/ml}$   
i = 1E7B12b, 22  $\mu\text{g/ml}$



### 3. LE TITRE.

Les graphiques obtenus d'après le dosage réalisé par la méthode ELISA en fonction de la dilution de l'anticorps considéré sont présentés dans les figures 13 à 16 .

Ils nous ont permis de déterminer la dilution maximale à laquelle on peut encore avoir une fixation de l'anticorps sur l'enzyme.

	Titre	Concent. (mg/ml)	Activ. spéc. (Unités)
1E7B12a	37200	4,27	8700
1E7B3	50800	0,76	66800
1E7C10	23500	1,09	21600
1E7B12b	32600	1,30	25000

### 4. COURBES D'INHIBITION.

#### a. Sur le sang de boeuf.

*Remarque* : L'enzyme pure étant un matériel très précieux, nous avons réalisé ces inhibitions sur l'enzyme des érythrocytes bovins, où elle se trouve en abondance.

#### a.1. En utilisant le TBHP comme substrat.

Les différentes courbes d'inhibition obtenues avec les quatre clones sont reproduites aux figures 17 à 20.

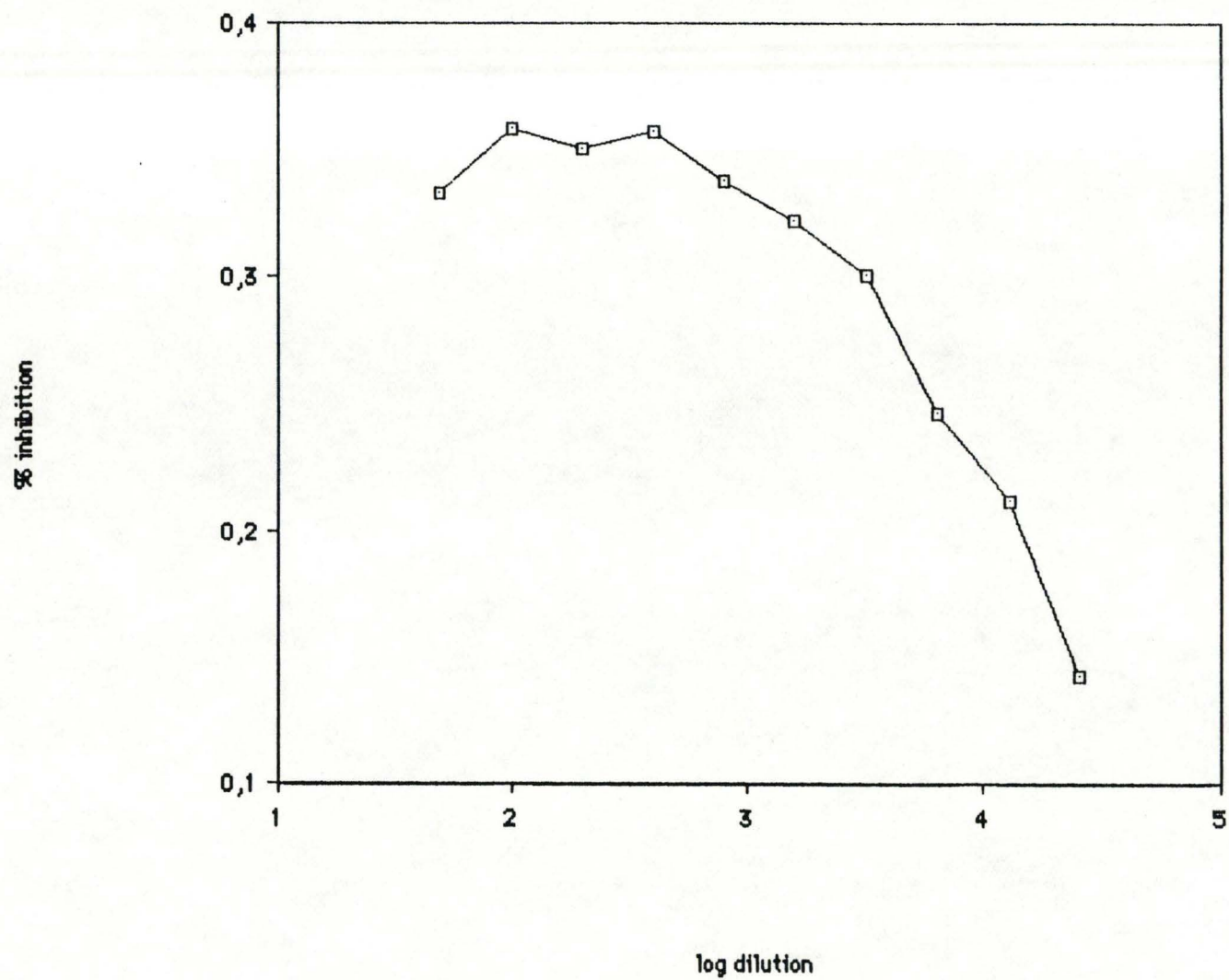


FIGURE 13  
Test ELISA réalisé sur l'anticorps monoclonal anti-glutathion  
peroxydase 1E7B12 a.

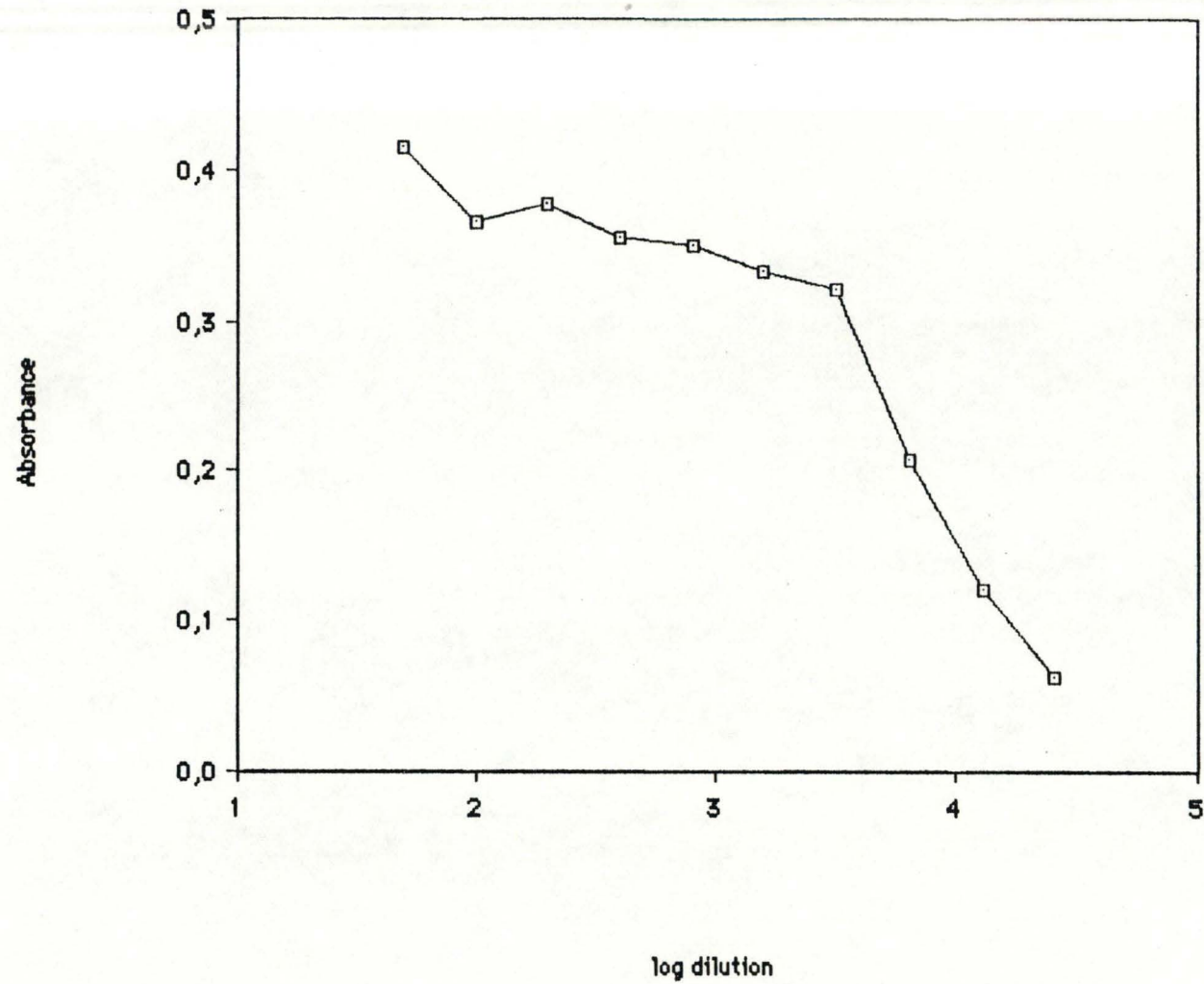


FIGURE 14

Test ELISA réalisé sur l'anticorps monoclonal anti-glutathion peroxydase 1E7B3.

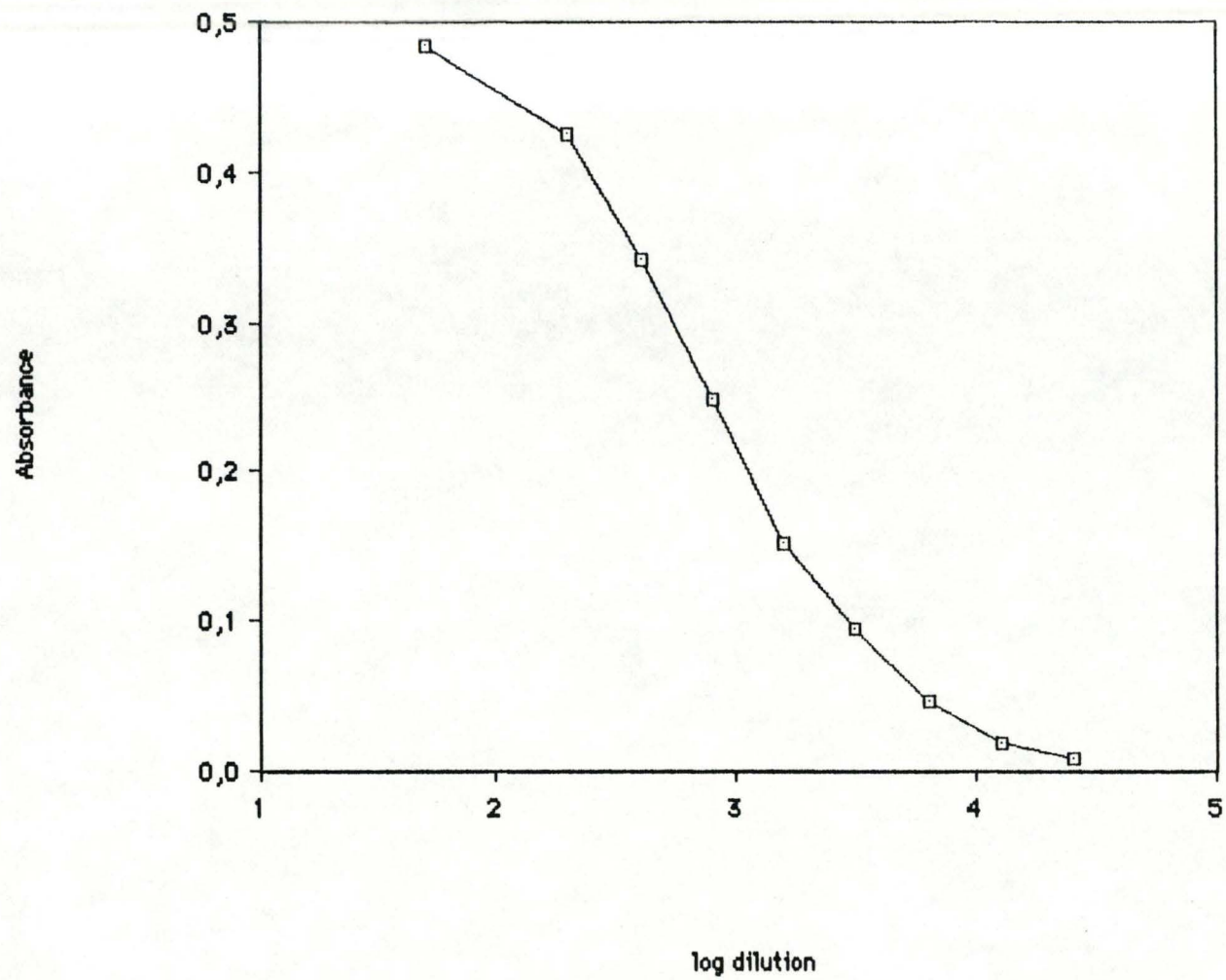


FIGURE 15

Test ELISA réalisé sur l'anticorps monoclonal anti-glutathion peroxydase 1E7C10.

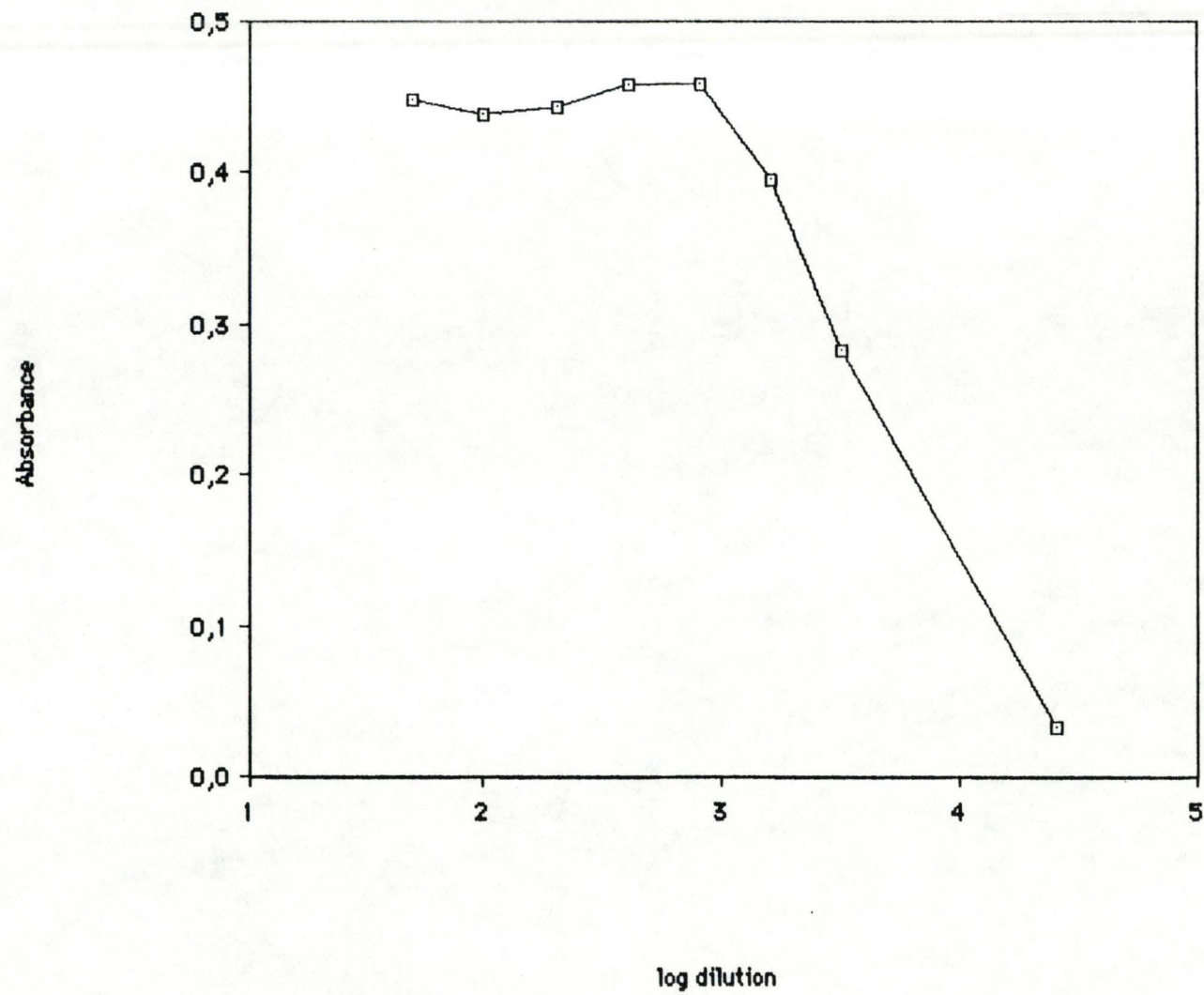


FIGURE 16

Test ELISA réalisé sur l'anticorps monoclonal anti-glutathion peroxydase 1E7B12b.

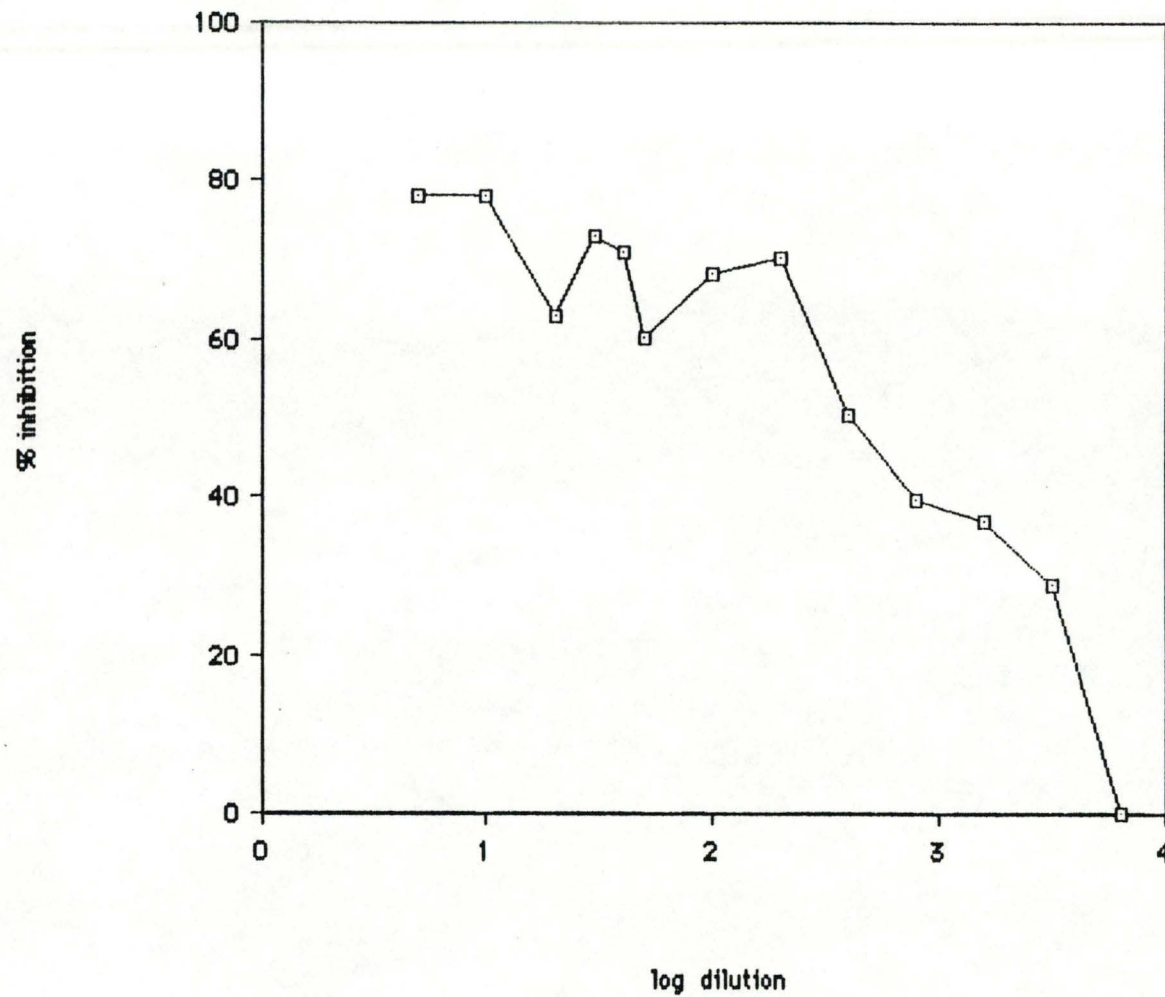


FIGURE 17

Les anticorps monoclonaux anti-glutathion peroxydase 1E7B12a ont été incubés en présence de l'enzyme qui se trouvait dans le sang de bovin. L'action de l'anticorps est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle qui ne contenait pas d'anticorps.

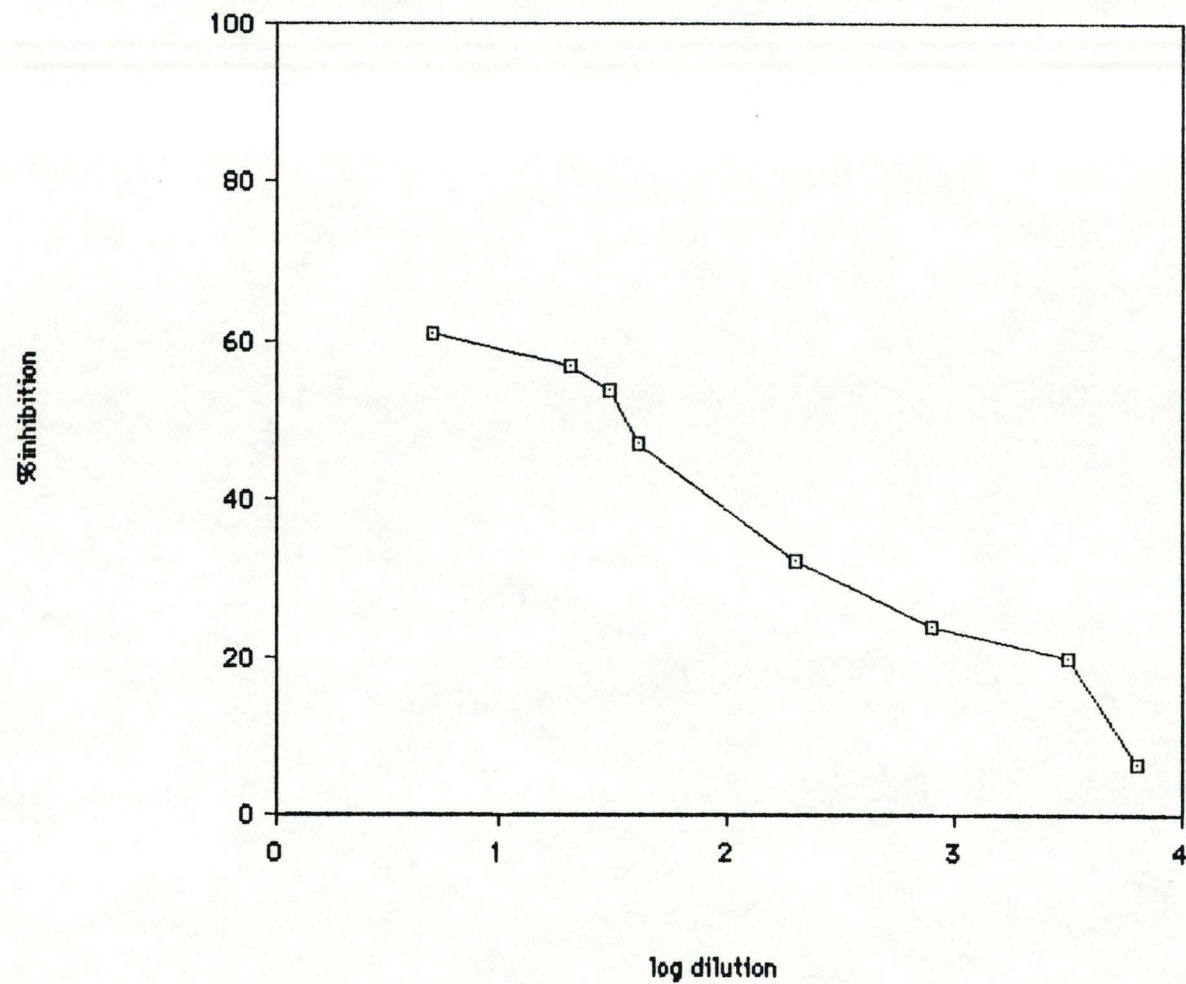


FIGURE 18

Les anticorps monoclonaux anti-glutathion peroxydase 1E7B3 ont été incubés en présence de l'enzyme qui se trouvait dans le sang de bovin. L'action de l'anticorps est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle qui ne contenait pas d'anticorps.

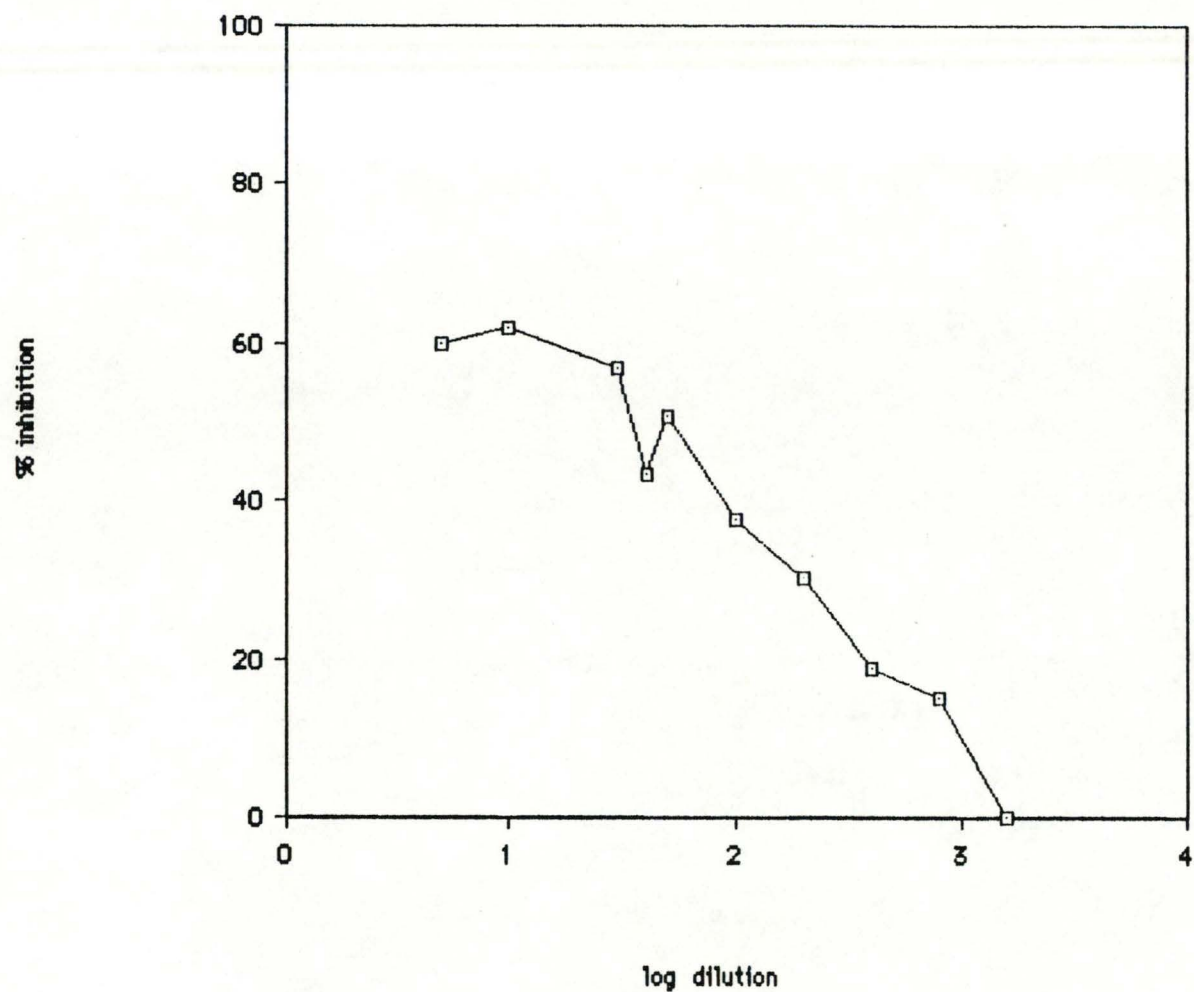


FIGURE 19

Les anticorps monoclonaux anti-glutathion peroxydase 1E7C10 ont été incubés en présence de l'enzyme qui se trouvait dans le sang de bovin. L'action de l'anticorps est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle qui ne contenait pas d'anticorps.

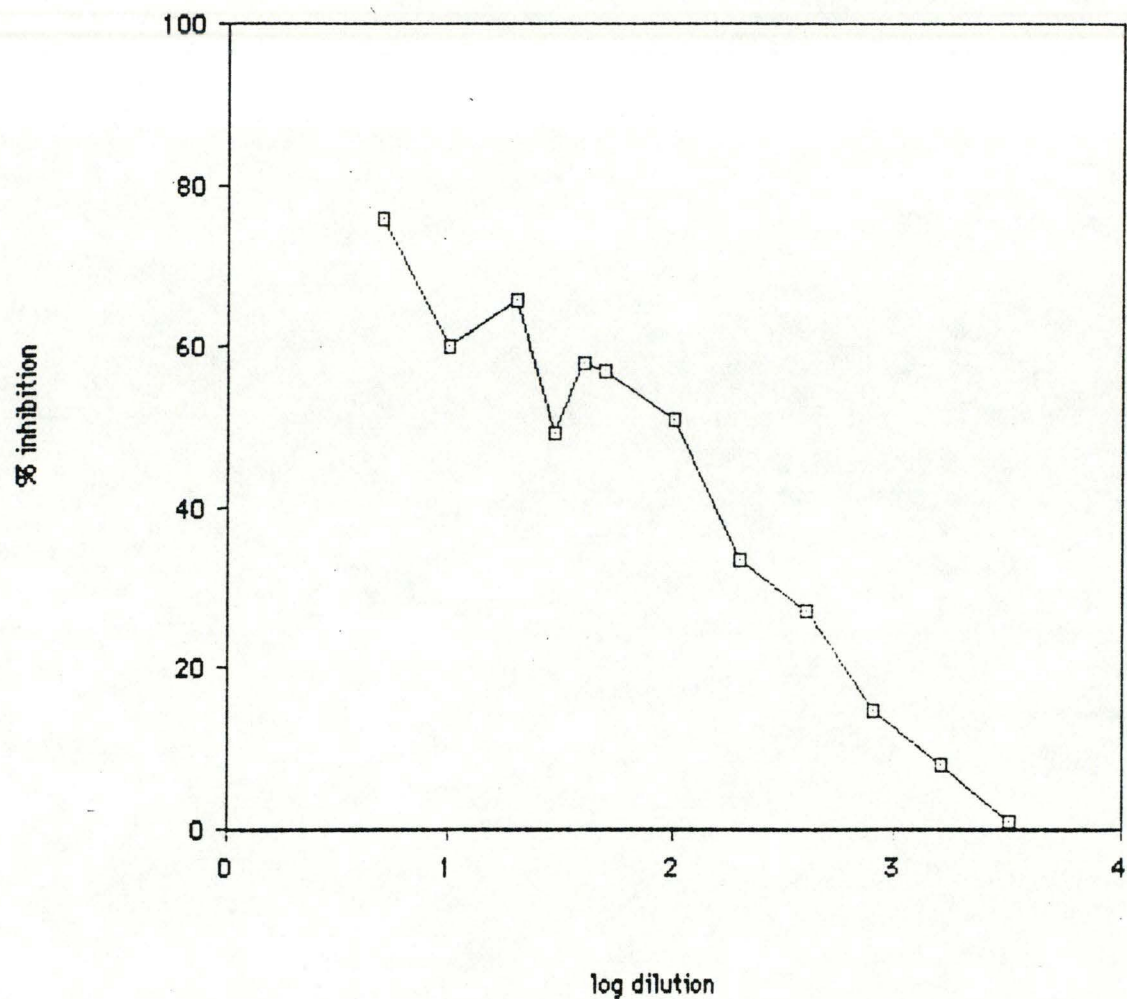


FIGURE 20

Les anticorps monoclonaux anti-glutathion peroxydase 1E7B12b ont été incubés en présence de l'enzyme qui se trouvait dans le sang de bovin. L'action de l'anticorps est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle qui ne contenait pas d'anticorps.

Certaines indications peuvent être tirées de ces résultats :

- on n'arrive jamais à une inhibition totale de l'enzyme même avec de faibles dilutions des anticorps.

- le maximum d'inhibition obtenu est de 80 % avec 1E7B12a et 1E7B12b.

- le pouvoir d'inhibition de 1E7B3 et 1E7C10 est plus faible que les deux autres anticorps (60 % au maximum).

- la dernière dilution à laquelle on observe encore une inhibition est d'environ :

4900 pour 1E7B12a

6200 pour 1E7B3

1500 pour 1E7C10

2800 pour 1E7B12b.

Elle est donc variable selon l'anticorps considéré.

- l'inhibition obtenue par ces anticorps est relativement importante (60 à 80 %), ce qui suggère un effet stérique important sur le substrat. Comme nous recherchions un maximum d'inhibition, nous voulions tester des combinaisons de plusieurs de ces anticorps en présence de l'enzyme. Comme nous disposions de quatre anticorps, plusieurs combinaisons étaient possibles : nous en avons choisi une arbitrairement par le mélange molaire de 1E7B12a et 1E7C10 à une concentration de départ de 0,87 mg/ml (figure 21).

Le résultat escompté n'était pas du tout atteint, bien au contraire. En combinant un anticorps de pouvoir inhibiteur "fort" (1E7B12a) et un autre plus "faible" (1E7C10), nous obtenions un graphique (figure 21) ressemblant à 1E7C10 seul (figure 19). L'hypothèse que nous avons alors émise était que 1E7C10 avait plus d'affinité pour la glutathion peroxydase et que, se fixant le premier sur l'antigène, il empêchait la fixation du second anticorps. Cela peut se comprendre si on imagine que chaque anticorps monoclonal, de 150000 de poids moléculaire, peut se fixer sur chacune des sous-unité de l'enzyme qui a un poids moléculaire de 85000. Si

ies deux déterminants antigéniques sont proches il est sans doute difficile de fixer un deuxième anticorps. Celui qui a le plus d'affinité se fixera le premier et déterminera ainsi le pouvoir d'inhibition.

Nous avons alors réalisé la même expérience, mais cette fois en choisissant les deux anticorps qui donnaient la plus forte inhibition, à une concentration de départ de 0,65 mg/ml (figure 22). On remarque que l'inhibition atteinte est cette fois de 80 %, c'est-à-dire semblable à celle obtenue avec chacun des deux anticorps pris séparément. On ne parvient donc pas à augmenter l'inhibition en additionnant deux anticorps.

Nous avons alors essayé d'inhiber davantage la glutathion peroxydase par la combinaison de trois (à une concentration de 0,40 mg/ml, sans dilution) puis de quatre anticorps (à une concentration de 0,31 mg/ml, sans dilution) (figures 23 et 24).

Les résultats ne sont pas meilleurs que ceux obtenus pour les anticorps isolés. Le raisonnement développé pour expliquer le premier résultat apparaît donc comme correct. Tout se passe comme si un seul anticorps pouvait se fixer par sous-unité d'enzyme et c'est celui qui a le plus d'affinité pour son déterminant antigénique. Dans les exemples montrés aux figures 21 à 24, il s'agirait de l'anticorps 1E7C10, puisque, lorsqu'il est présent (figures 21, 23 et 24), les courbes d'inhibition ressemblent à celles obtenues avec l'anticorps pris séparément.

#### a.2. En utilisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat.

L'ensemble des expériences précédentes a été réalisé en utilisant le tert-butylhydroperoxyde (TBHP) comme substrat de la glutathion peroxydase. Nous nous sommes alors posé la question de savoir si en utilisant un substrat plus petit, comme par exemple le peroxyde d'hydrogène, nous allions encore obtenir la même inhibition.

Nous avons donc testé l'effet de l'anticorps 1E7C10 sur la glutathion peroxydase en utilisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat : l'inhibition de

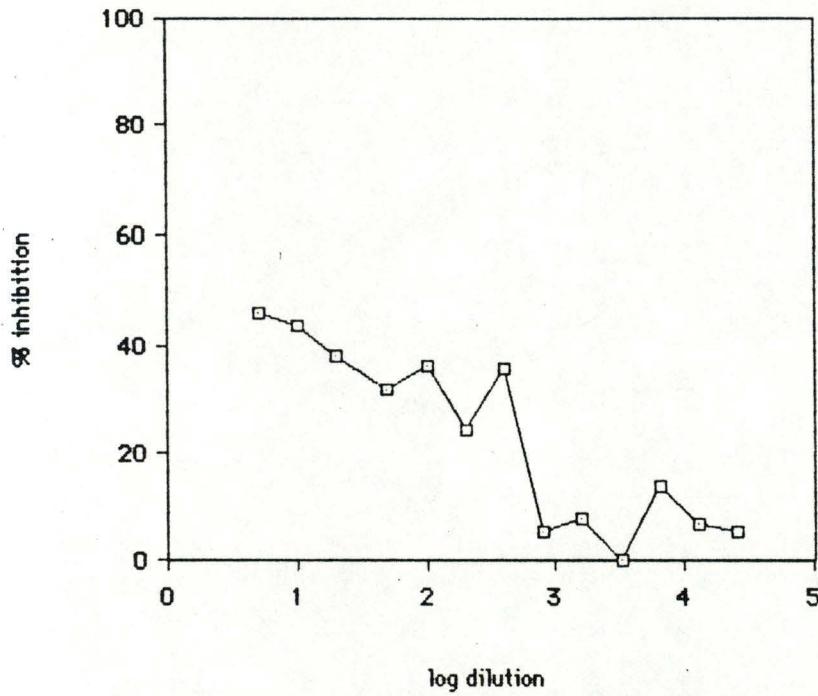


FIGURE 21

L'expérience d'inhibition de la glutathion peroxydase a été réalisée par un mélange des anticorps monoclonaux anti-glutathion peroxydase 1E7B12a et 1E7C10.

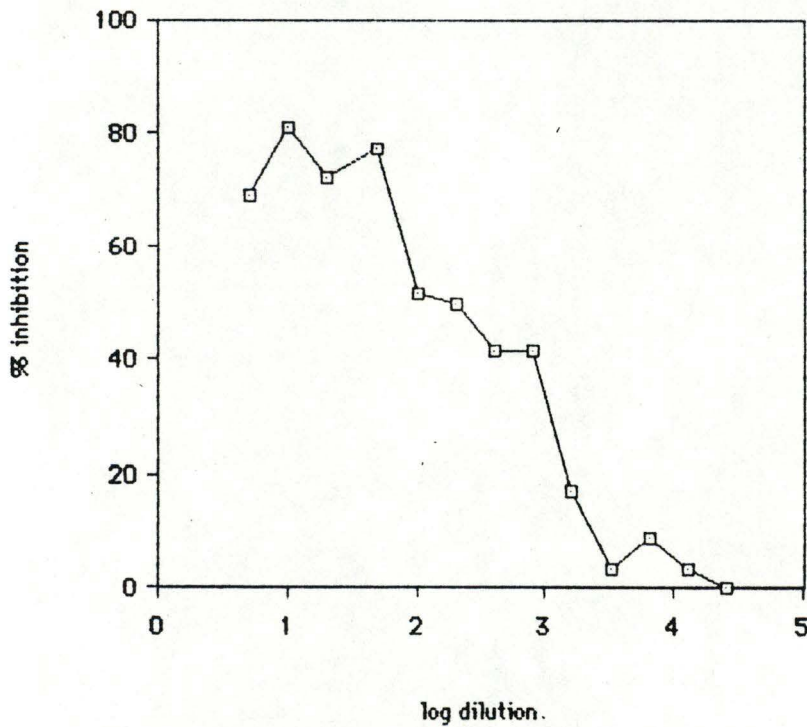


FIGURE 22

L'expérience d'inhibition de la glutathion peroxydase a été réalisée par un mélange des anticorps monoclonaux anti-glutathion peroxydase 1E7B12a et 1E7B12b.

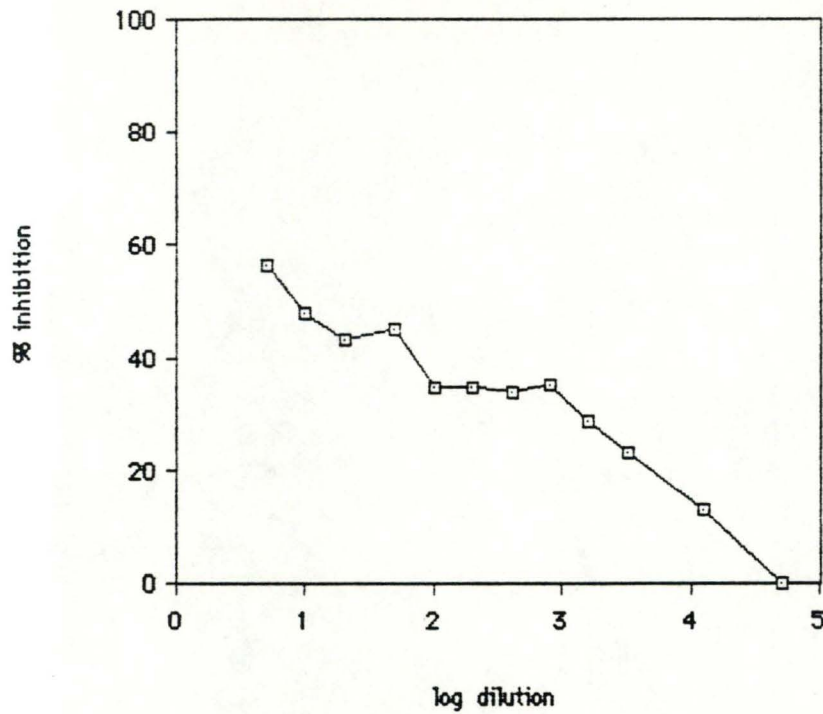


FIGURE 23

L'expérience d'inhibition de la glutathion peroxydase a été réalisée par un mélange des anticorps monoclonaux anti-glutathion peroxydase 1E7B12a, 1E7C10 et 1E7B3.

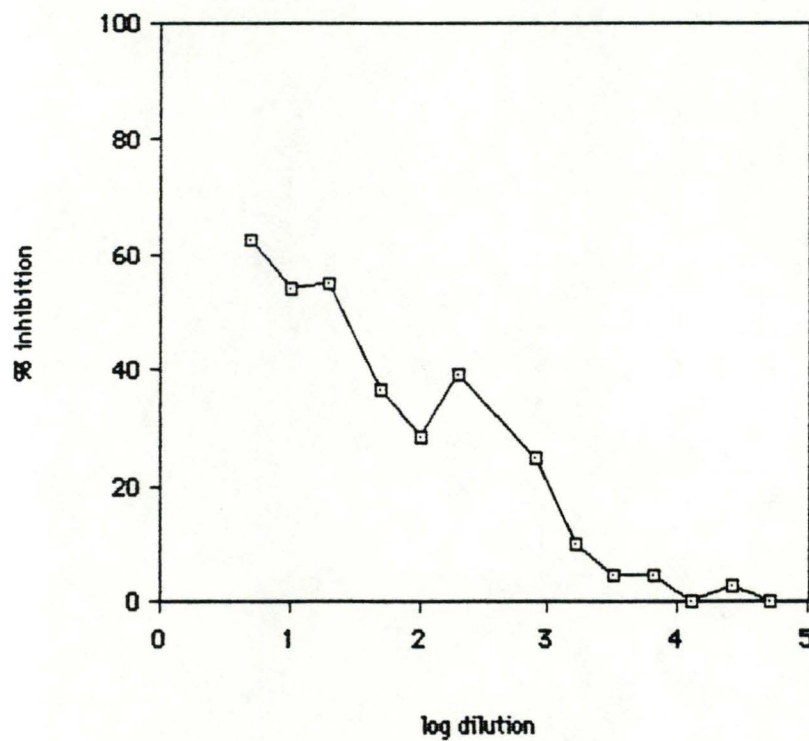


FIGURE 24

L'expérience d'inhibition de la glutathion peroxydase a été réalisée par un mélange des anticorps monoclonaux anti-glutathion peroxydase 1E7B12a, 1E7C10, 1E7B3 et 1E7B12b.

l'activité de l'enzyme est plus faible que celle observée en présence de TBHP (figure 25). Ce test n'a été réalisé qu'en présence d'un seul anticorps mais les résultats sont très significatifs.

La différence d'inhibition s'explique bien si l'on considère la taille des deux substrats. En effet, le peroxyde d'hydrogène, plus petit que le TBHP, diffusera plus facilement vers le site actif de l'enzyme, tandis que le TBHP, plus imposant, subira davantage l'effet de l'encombrement stérique induit par la présence d'un anticorps fixé sur l'enzyme. L'inhibition observée est donc probablement bien d'ordre stérique, comme d'ailleurs la plupart des effets inhibiteurs des anticorps sur les enzymes. Ce résultat entraîne cependant une autre conséquence : dans la cellule, la glutathion peroxydase agit sur des hydroperoxydes à chaînes relativement longues et on peut donc imaginer que dans ces conditions, l'inhibition par les anticorps sera au moins aussi importante que dans l'exemple du TBHP.

#### b. Test d'inhibition de l'enzyme du surnageant de fibroblastes humains.

Nous avons testé le pouvoir inhibiteur des quatre anticorps anti-glutathion peroxydase sur des surnageants de fibroblastes humains, selon la technique décrite dans "Matériels et Méthodes" (pages 29 à 31).

Comme le montrent les résultats du Tableau II, aucun ne provoquait une diminution de l'activité de l'enzyme dans ces conditions.

De telles expériences nous suggèrent que les séquences en acides aminés de la glutathion peroxydase bovine et de la glutathion peroxydase humaine sont suffisamment différentes pour que les épitopes ne soient plus reconnus par les anticorps. Cette hypothèse n'est cependant pas vérifiable actuellement puisque, si la séquence en acides aminés de la glutathion

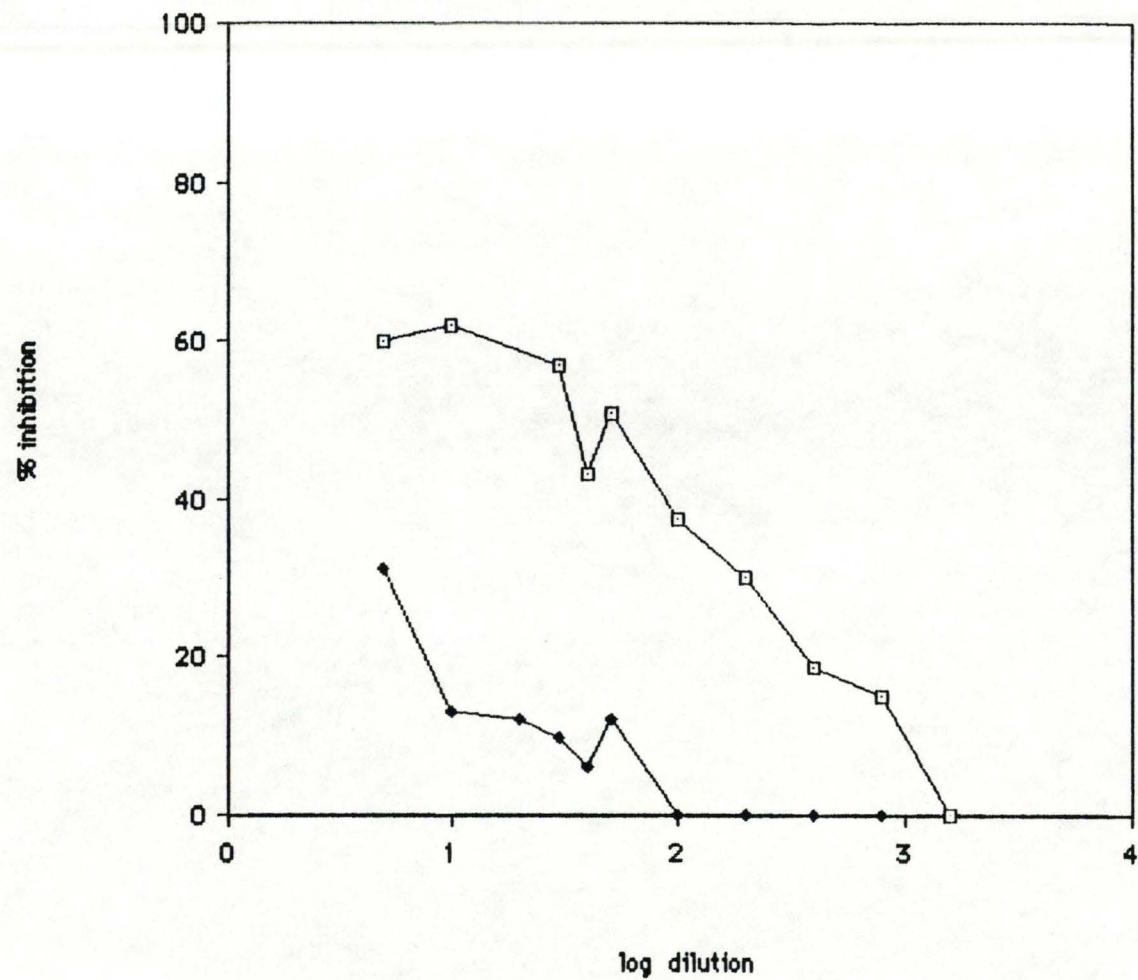


FIGURE 25

Inhibition de la glutathion peroxydase obtenue en présence d'anticorps monoclonaux 1E7C 10 et en mesurant l'activité de l'enzyme avec du TBHP (□) ou de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●).

TABLEAU II

Effet inhibiteur des divers anticorps anti-glutathion peroxydase sur l'activité de l'enzyme présente dans des surnageants cellulaires.

	sang de boeuf	surnageant de chondrocytes frais	surnageant de chondrocytes cultivés	surnageant de fibroblastes humains
Protéines :				
- mg/10 <sup>6</sup> cell	/	56,58	88,46	118,78
Activité de la Gpx :				
- Unités/ml	25,38	/	/	/
- U / 10 <sup>6</sup> cell	/	2,71 10 <sup>-2</sup>	2,39 10 <sup>-2</sup>	2,35 10 <sup>-2</sup>
% d'inhibition de	dil. 1/5	dil. 1/25	dil. 1/25	dil. 1/25
- 1E7B12a	85	63	56	0
- 1E7B3	61	50	40	0
- 1E7C10	62	54	47	0
- 1E7B12b	76	57	50	0
- 1E7B12a+C10	46	/	/	/
- 1E7B12a+b	81	/	/	/
- B12a+B3+C10	56	/	/	/
- 4 Antic.	62	/	/	/

peroxydase bovine a été publiée (Günzler *et al.*, 1984), on ne connaît pas encore celle de la glutathion peroxydase humaine.

c. Test d'inhibition de l'enzyme du surnageant de chondrocytes bovins.

Ces expériences étaient nécessaires en tant que préliminaires à la microinjection. Nous avons démontré que les anticorps sont actifs (en ce sens qu'ils diminuent l'activité de l'enzyme) sur les érythrocytes bovins, mais encore faut-il qu'ils le soient sur les chondrocytes, cellules qui allaient être utilisées lors de la microinjection.

Les résultats présentés dans les graphiques ci-après (figure 26 à 29) sont conformes à ce que nous attendions. L'inhibition obtenue aussi bien sur des chondrocytes prélevés directement sur des cartilages et non cultivés que sur des chondrocytes cultivés pendant cinq générations est du même ordre de grandeur que celle réalisée sur les érythrocytes.

Il existe parfois de petits écarts entre les diverses expériences mais il faut savoir qu'elles ont été réalisées séparément et qu'une variation de quelques pourcents peut être observée d'une fois à l'autre. Nous ne pensons donc pas qu'il faille interpréter ces légères différences comme significatives de différences de sensibilité de ces enzymes aux anticorps.

Une fois ces expériences faites et les résultats sur l'enzyme des globules rouges bovins confirmés par les expériences sur les chondrocytes, nous pouvons utiliser les chondrocytes pour les expériences de microinjection.

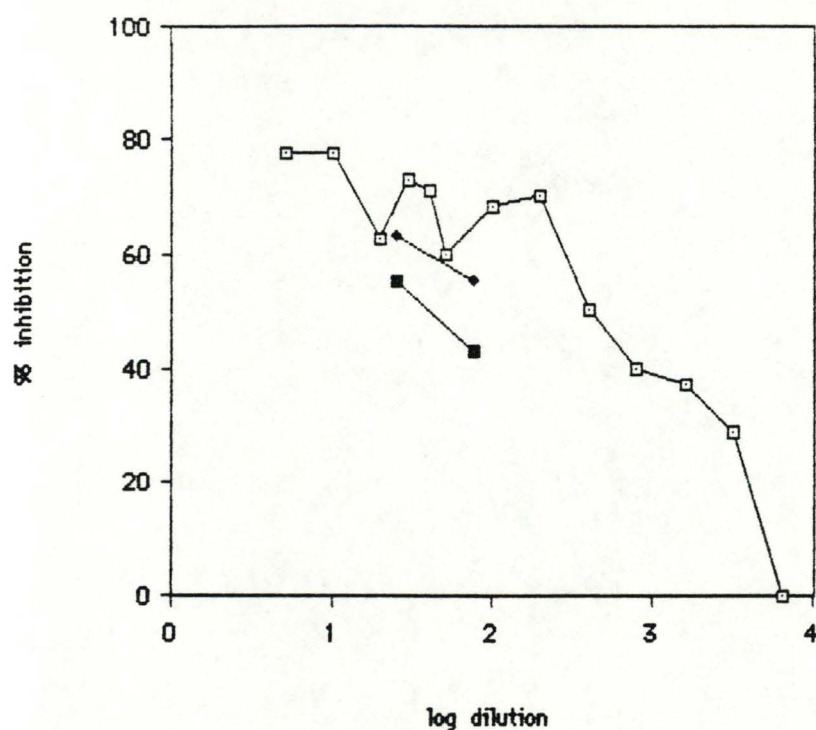


FIGURE 26

Inhibition de la glutathion peroxydase en présence des anticorps monoclonaux 1E7B12a sur les érythrocytes (□), sur des chondrocytes non cultivés (●), et sur des chondrocytes cultivés pendant 5 générations (■).

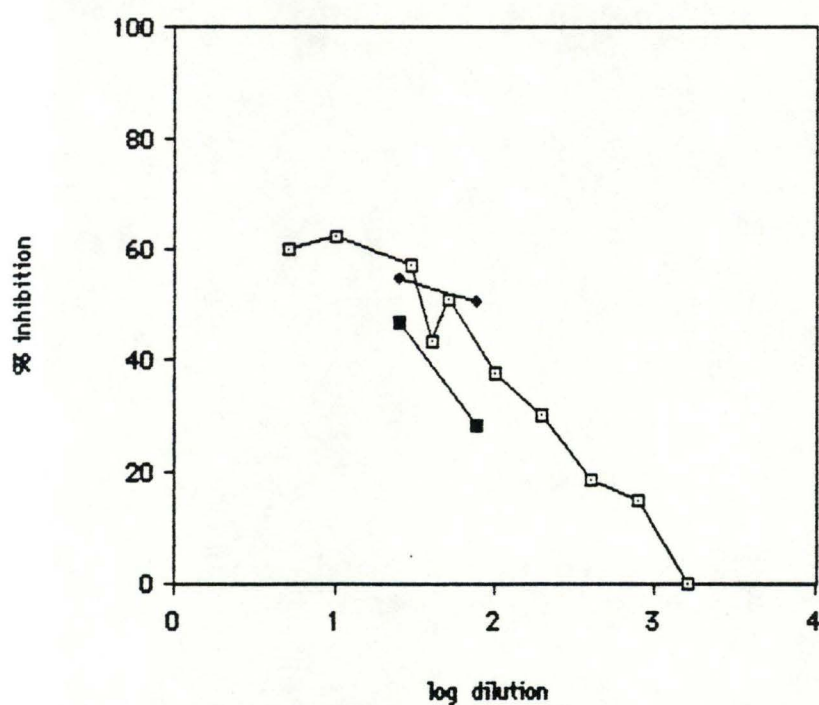


FIGURE 27

Inhibition de la glutathion peroxydase en présence des anticorps monoclonaux 1E7C10 sur les érythrocytes (□), sur des chondrocytes non cultivés (●), et sur des chondrocytes cultivés pendant 5 générations (■).

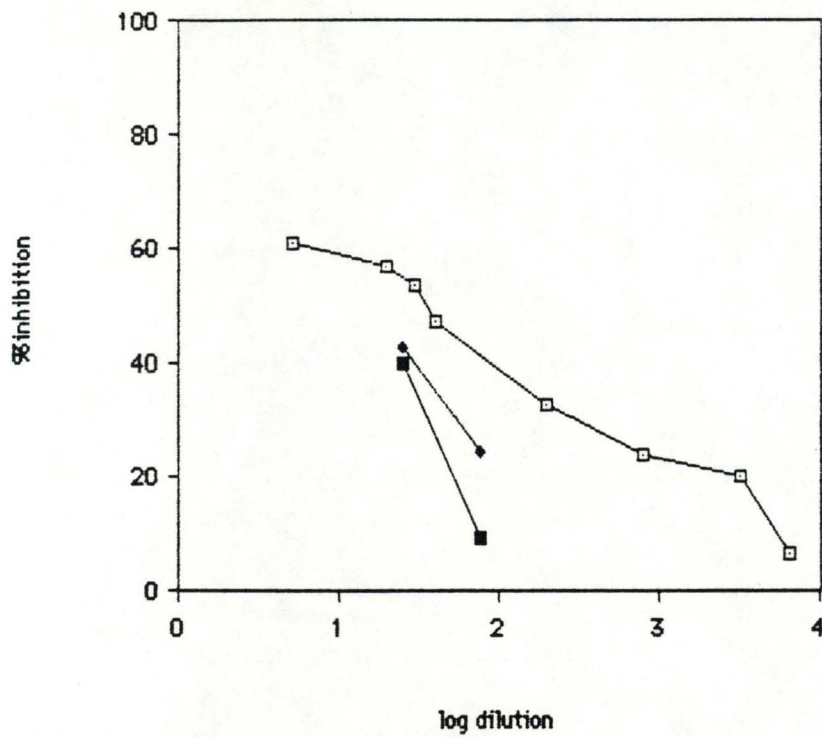


FIGURE 28

Inhibition de la glutathion peroxydase en présence des anticorps monoclonaux 1E7B3 sur les érythrocytes (□), sur des chondrocytes non cultivés (◆), et sur des chondrocytes cultivés pendant 5 générations (■).

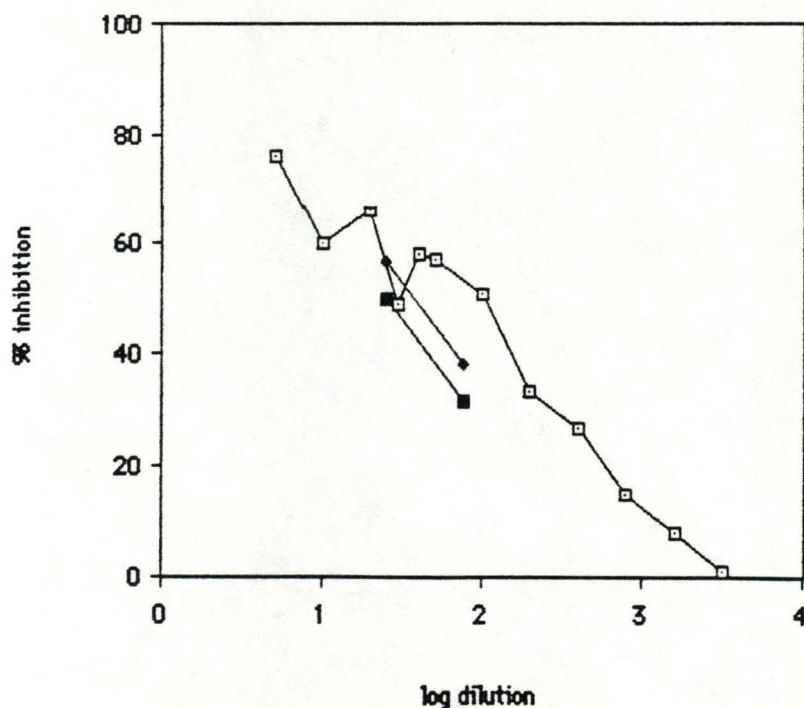


FIGURE 29

Inhibition de la glutathion peroxydase en présence des anticorps monoclonaux 1E7B12b sur les érythrocytes (□), sur des chondrocytes non cultivés (◆), et sur des chondrocytes cultivés pendant 5 générations (■).

### UTILISATION DES ANTICORPS POUR LA MICROINJECTION DES CHONDROCYTES.

Au terme de ces expériences de caractérisation, nous pouvons commencer les premières expériences d'utilisation des anticorps monoclonaux contre la glutathion peroxydase, c'est-à-dire inhiber l'enzyme dans les cellules grâce à l'injection de ces anticorps et observer l'effet physiologique de cette inhibition sur le comportement cellulaire.

Nous avons choisi, pour l'injection, la combinaison des deux anticorps grâce auxquels nous obtenions la meilleure inhibition de l'enzyme à savoir 1E7B12a et 1E7B12b, à une concentration de 1 mg/ml, et nous avons suivi les cellules injectées pendant une semaine en les cultivant sous une atmosphère normale (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % air).

De ces expériences (figure 30), il ressort que :

- les chondrocytes injectés avec du tampon se comportent de la même façon que les chondrocytes non injectés, donc l'injection par elle-même n'altère pas la viabilité des cellules.

- ces chondrocytes ont été cultivés à très faible densité (0,56 cellule / mm<sup>2</sup>) et dans ces conditions ils ne se multiplient plus, contrairement aux fibroblastes (C. Michiels, 1985).

- les cellules injectées avec des anticorps dirigés contre la glutathion peroxydase meurent plus rapidement que les autres et cela pendant les trois premiers jours. Par la suite, les droites correspondant aux cellules injectées avec des anticorps, avec du tampon et non injectées deviennent parallèles; la mortalité des cellules se stabilise et devient donc identique dans tous les cas. Cela peut s'expliquer quand on sait que la plupart des protéines injectées dans des cellules sont autophagocytées après deux à trois jours selon la nature de la molécule introduite, comme l'a montré Stacey (1977) sur des cellules Hela. Après trois jours, nous pouvons dès

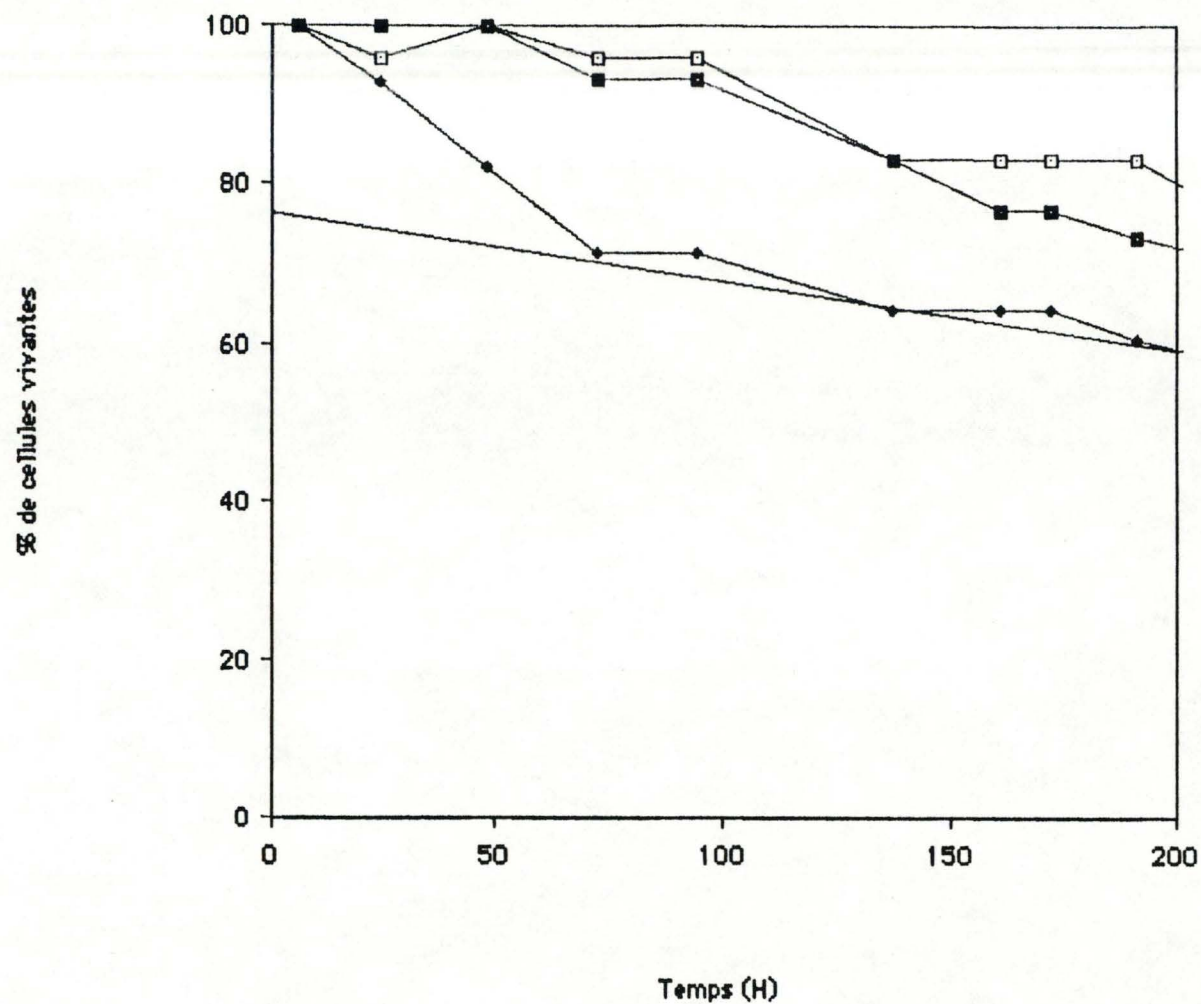


FIGURE 30

Survie des chondrocytes, exprimée en pourcentage de cellules vivantes par rapport au nombre de cellules injectées, en fonction du temps de culture après l'injection. Pour chaque expérience, 35 chondrocytes ont été injectés avec des anticorps anti-glutathione peroxydase (◆); d'autres ont été injectés avec du tampon (□) et certains n'ont pas été injectés (■).

lors supposer que nos anticorps ont été neutralisés. Il est donc logique de ne plus observer de différence dans la mortalité des cellules injectées avec des anticorps par rapport à celle des deux autres types de cellules (injectées avec du tampon et non injectées).

L'extrapolation de la courbe de survie obtenue entre trois et huit jours au temps zéro d'injection indique que 23 % des cellules sont mortes au cours des trois premiers jours suite à l'injection des anticorps.

Le contrôle obtenu en injectant des IgG "normaux" avait été réalisé dans une expérience préliminaire et les résultats étaient identiques aux cellules injectées avec le tampon; ce contrôle n'a plus été refait dans cette expérience. Ceci confirme d'ailleurs les nombreuses expériences réalisées au laboratoire qui nous montrent que les cellules supportent très bien des injections de protéines comme le cytochrome b5 (V. Hénin), d'enzymes antioxydantes (M. Raes), d'anticorps (C. Michiels) et même de mitochondries lorsqu'elles sont dans un bon état physiologique (P. Corbisier). Dans tous ces cas, la mortalité des cellules due à l'injection varie de 0 à 5 % environ.

#### Chapitre 4 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

En conclusion, il apparaît que l'injection d'anticorps anti-glutathion peroxydase, dont nous avons montré l'effet inhibiteur important sur l'enzyme, peut entraîner, au cours des trois premiers jours après l'injection, une mortalité importante chez les chondrocytes injectés. Cette observation, bien que préliminaire, ouvre une série de perspectives intéressantes quant à l'utilisation de ces anticorps comme moyen d'étude de l'importance des phénomènes radicalaires dans la dégénérescence des cellules. En effet, l'utilisation de ces anticorps permet de diminuer spécifiquement une des défenses principales de la cellule contre les attaques radicalaires et donc de connaître son importance physiologique. Cette approche est complémentaire à une série de travaux, déjà réalisées dans notre laboratoire (Raes *et al.*, 1987), qui consistaient à augmenter les défenses cellulaires en injectant les différentes enzymes antioxydantes - seules ou combinées - dans la cellule, soumise à des conditions stressantes d'hyperoxie. L'analyse de l'effet protecteur ainsi obtenu révèle d'ailleurs que c'est la glutathion peroxydase qui montre l'effet protecteur le plus marqué. Des expériences supplémentaires d'injection d'anticorps anti-glutathion peroxydase devraient donc permettre de mieux situer le rôle de la glutathion peroxydase dans la protection contre le stress oxydatif.

Enfin, nous avons choisi d'injecter les anticorps anti-glutathion peroxydase dans un type cellulaire particulier, le chondrocyte. In vivo, les chondrocytes se développent dans un tissu faiblement vascularisé et donc dans un environnement pauvre en oxygène, le cartilage.

Dans un premier temps, nous pensons que les anticorps préparés pourront se révéler utiles pour définir l'importance des phénomènes radicalaires dans la physiologie normale des chondrocytes. La comparaison avec les cellules fibroblastiques nous permettra également de mieux mettre en évidence comment différents types cellulaires régulent leur métabolisme anti-oxydatif.

Pour observer plus finement ces problèmes de régulation de l'expression des enzymes anti-oxydantes et pour permettre une observation à plus long terme (nos anticorps étant rendus inefficaces trois jours au plus après l'injection), on pourra faire appel aux techniques de clonage de l'ADN et obtenir l'ARN et le cDNA correspondant à la glutathion peroxydase. Les cDNA de la superoxyde dismutase et de la catalase ont déjà été isolés et sont disponibles (Hallewell *et al.*, 1985; Furuta *et al.*, 1986).

Dans un second temps, les anticorps anti-glutathion peroxydase devraient également nous permettre de mieux comprendre certaines pathologies du cartilage telles que la polyarthrite rhumatoïde. En effet, lors de cette maladie, l'inflammation active une série de processus produisant entre autres des radicaux dérivés de l'oxygène en quantité importante. Ces radicaux peuvent ainsi altérer le métabolisme des chondrocytes, contribuant aux conditions pathologiques.

En conclusion, l'utilisation de techniques performantes telles que la microinjection, associées au clonage génétique, devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle de la glutathion peroxydase ainsi que sa régulation, en fonction de l'environnement cellulaire, de l'état de différenciation et de certaines conditions pathologiques.

**BIBLIOGRAPHIE.**

- Akerström, B., Brodin, T., Reis, K. and Björk, L., 1985 :**  
Rotein G : a powerful tool for binding and detection of  
monoclonal and polyclonal antibodies.  
J. Immunol., 135, 2589.
- Ansorge, W., 1982 :**  
Improved system for capillary microinjection in living cells.  
Exper. Cell Res, 140, 31.
- Brawn, K. and Fridovitch, I., 1981 :**  
DNA strand scission by enzymatically generated oxygen  
radicals.  
Arch. Biochem. Biophys. 206, 414.
- Burton, G.W., Cheeseman, K.H., Doba, T., Ingold, K.V. and  
Slater, T.F. :**  
Vitamin E as an antioxidant *in vitro* and *in vivo*  
*in Ciba Foundation Symposium*, vol. 101, 4, ed. Pitman,  
London, 1983.
- Comporti, M., 1985 :**  
Biology of disease. Lipid peroxidation and cellular damage in  
toxic liver injury.  
Lab. Invest. 53, 599.
- Doba, T., Burton, G.W. and Ingold, K.U., 1985 :**  
Antioxidant and coantioxidant activity of vitamin C. The  
effect of vitamin C either alone or in the presence of vitamin E  
or a water soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of  
aqueous multilamellar liposomes.  
Biochim. Biophys. Acta 835, 298.
- Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, C.R., 1978 :**  
Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from  
mouse serum using protein A-sepharose.  
Immunochem, 15, 429.

**Flohé, L. :**

Glutathione peroxydase : fact and fiction.  
*in* Ciba Foundation Symposium, 65, 95,  
Excerpta Medica, Amsterdam, 1979.

**Flohé, L. :**

Glutathione peroxydase brought into focus.  
*in* Free Radicals in Biology, (Pryor, W., ed), 5, 223, 1982,  
Academic Press, New York, 1982.

**Fridovitch, I., 1978 :**

The biology of oxygen radicals.  
Science 201, 875.

**Furuta, S., Hayashi, H., Hijikata, M., Miyazawa, S., Osumi, T. and Mashimoto, T., 1986 :**

Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver catalase.  
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 83, 313.

**Gordon, P. :**

Free radicals and the aging process.  
*in* Theoretical Aspects of Ageing (Rockstein, M., ed), 61,  
Academic Press, London, 1974.

**Graessman, A., Graessman, M. and Mueller, C., 1980 :**

Microinjection of early SV40 DNA fragments and T antigen.  
Meth. Enzymol., 65, 816.

**Grossmann, A. and Wendel, A. :**

Preparation of glutathione peroxydase from bovine erythrocytes.  
*in* C.R.C. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research,  
C.R.C. Press, (Greewald, R.A., ed), Boca Raton, 1985.

**Günzler, W.A., Steffens, G.J., Grossmann, A., Kim, S-M.A. and Otting, F., 1984 :**

The amino-acid sequence of Bovine Glutathion Peroxydase.  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 365, 195.

**Hallewell, R.A., Masiarz, F.R., Najarian, R.C., Puma, J.P., Clerioga, M.R., Rauldph, A., Sanchez-Pescudn, R., Scandella, C.J., Smith, B., Steimer, K.S. and Mullenbech, G.T., 1985 :**

Human Cu/Zn superoxyde dismutase cDNA; isolation of clones synthesising high levels of active or inactive enzyme from an expression timory.  
Nucl. Acid. Res., 13, 2017.

**Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C. :**

Free radicals, ageing and disease.

*in* Free Radicals in Biology and Medicine,

(Halliwell, J.M.C., ed), 296, Clarendon Press, Oxford, 1985.

**Hénin, V., 1981 :**

Microinjection du cytochrome b<sub>5</sub> dans les fibroblastes WI-38 et Etude de sa distribution sur les membranes subcellulaires.  
Mémoire de licence.

**Housset, B. and Junod, A., 1983 :**

Toxicité pulmonaire des radicaux libres de l'oxygène.  
Rev. Fr. Mal. Resp. 11, 3.

**Junot, A., 1986 :**

Data on oxidants and antioxidants.

Bull. Eur. Physiolpathol. Resp. 22, 253.

**Köhler, G., and Milstein, C., 1975 :**

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature, 256, 495.

**Leibovitz, B.E. and Siegel, M.S., 1980 :**

Aspects of free radical reactions in biological systems : aging.  
J. Gerontol. 35, 45.

**Lesko, S.A., Lorentzen, R.J. and Ts'o Pop, 1980 :**

Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission.  
Biochem. 19, 3023.

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall R.J., 1951 :**

Protein measurement with Folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem., 193, 295, 1951.

**Mainardi, C.L. :**

Collagenase in rheumatoid arthritis.  
// Biology, Chemistry, Pathology of the collagen, Ann. N.Y.  
Acad. Sci., 460, 345, 1985.

**Mason, D.W. and Williams, A.F., 1980 :**

The kinetics of antibody binding to membrane antigens in  
solution and at the cell surface.  
Biochem. J., 187, 1.

**Mc Cord, J.M., 1979 :**

SOD : Occurrence, Structure, Function and Evolution.  
Isoenzymes :Cur. Top. Biol. Med. Res., 1, 1.

**Mc Cord, J.M., and Fridovitch, I., 1978 :**

The biology and pathology of oxygen radicals.  
Annals of Internal Medicine, 89, 122.

**Michiels, C., 1985 :**

Importance des systèmes de défense contre les dérivés de  
l'oxygène dans la dégénérescence cellulaire.  
Mémoire de licence.

**Ozato, K., Mayer, N. and Sachs, D.H., 1980 :**

Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to  
mouse H-2 and Ia antigens.  
J. Immunol., 142, 533.

**Pederson, T.C., et Aust, S.D., 1972 :**

NADPH-dependent lipid peroxidation catalysed by purified  
NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes.  
Biochem. Biophys. Research. Commun. 48, 789.

- Raes M., Michiels C. and Remacle J., 1987 :**  
Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen derived free radicals : the key role of glutathione peroxydase.  
J. Free Rad. Biol. Med., (sous presse).
- Roberfroid, M.B., Viehe, H.G. and Remacle, J., 1986 :**  
Free radicals in drug research.  
Adv. Drug. Res., (sous presse).
- Russo, C., Callegaro, L., Lanza, E. and Ferrone, S., 1983 :**  
Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation.  
J. Immunol. Meth., 65, 269.
- Sevag, M. and Maiwez, L., 1934 :**  
J. Exp. Med., 60, 95.
- Stacey, D.W. and Alfrey, V.G., 1977 :**  
Evidence for the autophagy of microinjected proteins in HeLa Cells.  
J. Cell. Biol., 75, 807.
- Stocks, J., Dormandy, T., 1973 :**  
Brit. J. Haemat., 20, 95.
- Suttorp, N., Toepfer, W. and Roka, L., 1986 :**  
Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells : glutathione redox cycle versus catalase.  
Am. J. Physiol. 251 (Cell physiol. 20), 671.
- Tappel, A.L., et Dillard, C.J., 1981 :**  
*in vivo* lipid peroxidation : measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E.  
Fed. Proc. 40, 174.
- Tappel, A.L., 1973 :**  
Lipid peroxidation damage to cell components.  
Federation proceedings, 32, 8, 1870-1874.

**Trush, M.A., Mimmouch, E.G. and Gram, T.E., 1982 :**

Activation of pharmacologic agents to radical intermediates :  
implications for the role of free radicals in drug action and  
toxicity.

Biochem. Pharmacol. 31, 3335.

**Turrens, J.F. and Boveris, A., 1980 :**

Generation of superoxide anion by the NADH deshydrogenase of  
bovine heart mitochondria.

Biochem. J. 191, 421.